

Aus dem Institut für Pharmakologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Thomas Worzfeld

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die Funktion des Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC)-
Komplexes und nukleärer Aktin-Polymerisation in der Myocardin
Related Transcription Factor A (MRTF-A) regulierten
Tumorzellinvasion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Maximilian Per Geißler

aus

Hamburg

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: **26.11.2020**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan i.V. der Prodekan: Prof. Dr. Rolf Müller

Referent: Prof. Dr. Robert Grosse, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

1. Korreferent: PD Dr. Wolfgang Meißner

*meiner Familie
und meiner Lena*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
I. Abkürzungsverzeichnis.....	6
II. Abbildungsverzeichnis	8
1. Einleitung.....	9
1.1 Aktin als zytoskelettaler Bestandteil.....	9
1.2 Die zellkernständige Aktinfraktion	15
1.3 Die transkriptionelle Steuerung von SRF durch MRTF.....	19
1.4 Das Kernnetzwerk und der LINC-Komplex.....	21
1.5 Integrin-vermittelte Dynamik des Aktin-Zytoskeletts.....	25
1.6 Die unmittelbare extrazelluläre Umgebung.....	28
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	30
2. Material	31
2.1 Zelllinien	31
2.2 Materialien für die Zellkultur	31
2.3 Substanzen, Reagenzien und Enzyme	32
2.4 Plasmide.....	32
3. Methoden	33
3.1 Zellbiologische Methoden	33
3.2 Mikroskopie.....	36
3.3 Methoden zur Beobachtung von nukleär-zytosolischem Proteinshuttling	37
3.4 Methoden zur Beobachtung von Tumorzellinvasion.....	38
3.5 Statistik	40
4. Ergebnisse.....	43
4.1 Die Auswirkung von löslichem bovinem Fibronectin auf die subzelluläre Lokalisation von MRTF-A-GFP	43
4.1.1 Fibronectin bewirkt die nukleäre Translokation von MRTF-A-GFP	43

4.1.2 Die Dynamik der nukleären Aktinfraktion während der Fibronectin-stimulierten MRTF-A-GFP Translokation	47
4.1.3 Die Aktivierung von fotostimulierbarem Rac1 bewirkt eine nukleäre Translokation von MRTF-A-GFP	47
4.2 Die Etablierung eines Invasionsexperimentes zur Live-Beobachtung	52
4.3 Die Dynamik von MRTF-A-GFP während der Tumorzellinvasion.....	54
4.4 Die Rolle der nukleären Aktinpolymerisation in der Zellinvasion	58
4.4.1 Die Dynamik von nukleären Aktinfilamenten während der Zellinvasion	58
4.4.2 Die Expression von BFP-NLS-actin-R62D verändert die Invasionsdynamik	62
4.5 Die Blockade des LINC-Komplexes in der Zellinvasion.....	67
4.6 Die Interaktion invadierender Zellen mit der extrazellulären Matrix	71
5. Diskussion	74
5.1 Bestandteile der extrazellulären Matrix kommunizieren mit dem MRTF-A/SRF Komplex in humanen HT1080-Tumorzellen.....	74
5.2 Ein geeigneter Invasions-Assay zur Live-Beobachtung	77
5.3 Nukleäre Aktinpolymerisation spielt eine Rolle im invasiven Verhalten von HT1080-Tumorzellen.....	79
5.4 Die Einbindung des LINC-Komplexes in das hier beschriebene Modell	82
5.5 Schlussfolgerung und Ausblick	85
III. Zusammenfassung auf Deutsch.....	87
IV. Abstract in English	89
V. Literaturverzeichnis	91
VI. Anhang	100
VII. Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	102
VIII. Danksagung	103

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADF	actin depolymerizing factor
BAF	Brg or hBrm associated factors
CH	Calponin homology
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein diacetate
DAD	Dia autoregulatory domain
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DID	Diaphenous inhibitory domain
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
ECM	extracellular matrix
EDMD	Emery-Dreifus muscular dystrophy
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FA	focal adhesions
FAK	focal adhesion kinase
FCS	fetal calf serum
FH	Formin-homology domain
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	green fluorescing protein
GTP	Guanosintriphosphat
HDR	homology directed repair
HGPS	Hutchinson-Gilford progeria syndrome
INM	inner nuclear membrane
KASH	Klarsicht-Anc1-Syne-homology
LASER	light amplification by stimulated emission of radiation
LINC	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton

mDia1 und mDia2	mammalian Diaphenous-related
MRTF	Myocardin related transcription factor
NA	nascent adhesions
Nesprin	nuclear envelope spectrin repeat protein
NLS	nuclear localization signal
NPF	nucleation promoting factors
NuMA	nuclear mitotic apparatus
N-WASP	neural-WASP
ONM	outer nuclear membrane
PALM	photoactivated localization microscopy
paRac1	photo-activatable Rac1
pTEFb	positive elongation factor b
RBD	Rho-binding domain
RFP	red fluorescing protein
RNA	ribonucleic acid
SCAI	suppressor of cancer cell invasion
SR	spectrin repeat
SRF	serum response factor
STORM	stochastic optical reconstruction microscopy
SUN	Sad1 and UNC-84
TCF	ternary complex factor
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP-family Verprolin homologue

II. Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Die Steuerung von MRTF-A/SRF durch nukleäres Aktin. Eigene Darstellung in Anlehnung an Grosse & Vartiainen (2013)</i>	<i>16</i>
<i>Abb. 2: Vereinfachte Struktur des LINC-Komplex an der Kernhülle. Eigene Darstellung in Anlehnung an Chang et al. (2015)</i>	<i>23</i>
<i>Abb. 3 Schematische Darstellung des Invasionsassays.....</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 4 MRTF-A-GFP während der Stimulation mit löslichem Fibronectin</i>	<i>45</i>
<i>Abb. 5 Quantifizierung des Fibronectin-induzierten MRTF-A-GFP Shuttlings.....</i>	<i>46</i>
<i>Abb. 6 Nukleäre Aktinfilamente während des Fibronectin-induzierten MRTF-A-GFP Shuttlings.....</i>	<i>49</i>
<i>Abb. 7 paRac1 vermitteltes Shuttling von MRTF-A-GFP</i>	<i>51</i>
<i>Abb. 8 Ein typisches Kollagen-Invasionsexperiment.....</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 9 Das MRTF-A-GFP Shuttling während der Kollagen-Invasion</i>	<i>56</i>
<i>Abb. 10 Nukleäre Aktinfilamente zeigen sich während der Kollagen-Invasion</i>	<i>60</i>
<i>Abb. 11 Die Invasion unter Expression von BFP-NLS/NLS-R62D-BFP sowie GFP/XPO6-GFP.....</i>	<i>65</i>
<i>Abb. 12 Die Invasion unter Expression von tagRFP/tagRFP-dn.KASH.....</i>	<i>69</i>
<i>Abb. 13 Die Invasion unter Expression von tagRFP und tagRFP-dn.KASH: Das Verhalten von MRTF-A-GFP.....</i>	<i>70</i>
<i>Abb. 14 Invasion in eine FITC-Kollagen-Matrix.....</i>	<i>73</i>
<i>Abb. 15 Funktion des LINC-Komplexes und der nukleären Aktin-Polymerisation in der MRTF-A regulierten Tumorzellinvasion. Eigene Darstellung</i>	<i>85</i>
<i>Anhang 1 Expressionskontrollen für Abb. 11</i>	<i>100</i>
<i>Anhang 2 Expressionskontrollen für Abb. 12.....</i>	<i>101</i>

1. Einleitung

1.1 Aktin als zytoskelettaler Bestandteil

Bedeutung für die Zelle und Struktur

Aktin ist das abundanteste Protein im menschlichen Zytosol und besitzt als Strukturprotein vielfältige Funktionen, über die im Folgenden ein Überblick gegeben wird. Zusammen mit den jeweils größeren Intermediärfilamenten und Mikrotubuli formt Aktin das komplexe Netzwerk, das als Zytoskelett bezeichnet wird (Fletcher & Mullins, 2010; Pollard, 2016). In seiner monomerischen Form liegt das Protein als globuläres G-Aktin vor, welches durch Bindung von ATP in den Spalt zwischen den beiden Hauptdomänen die Neigung erlangt, andere ATP-gebundene G-Aktin Moleküle zu binden und so zu einer rechtshändig helikalen, filamentösen Struktur zu aggregieren (Holmes, Popp, Gebhard, & Kabsch, 1990). In Verbindung mit assoziierten Proteinen wie dem Arp2/3-Komplex, Profilin und ADF/Cofilin bildet Aktin ein verzweigtes und durch gesteuerte Nukleation aktiv gestaltetes Netzwerk, welches durch sein gerichtetes Wachstum in der Lage ist, physikalische Kraft auf die Zelle und deren Umgebung auszuüben; durch diese Eigenschaft ist die Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation der entscheidende Mechanismus beim Verschieben der Zellmembran und damit der Migration der Zelle als Ganzem. Struktureller Ausdruck dieser mechanischen Kraft ist u.a. das Lamellipodium sich bewegender Zellen: Eine wenige Mikrometer messende Vorwölbung der Zellmembran, die aus einem Aktin-Netzwerk hoher Dichte gebildet wird und sich in Bewegungsrichtung der Zelle aufbaut (Pollard & Borisy, 2003).

Rolle von Aktin in Tumorzellen

Lamellipodien und die sie bildenden zytoskelettalen Strukturen stellen auch ein entscheidendes Merkmal migrierender, metastatischer Tumorzellen dar (Yamaguchi & Condeelis, 2007). Die Lamellipodien metastatischer Tumorzellen führen den Zellkörper entlang der Fasern extrazellulärer Matrix und machen dabei Gebrauch von Fokalen Adhäsionen – zelluläre Gebilde aus Integrinen, die das Aktin-Zytoskelett mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix verbinden (Condeelis & Segall, 2003; Kechagia, Ivaska, & Roca-Cusachs, 2019). Die Dynamik von Lamellipodien durch Aktin-Polymerisation ist in den motilsten Zellen eines Tumors durch verstärkte Expression von Cofilin erhöht (Sahai, 2007; W. Wang et al., 2006), was in der Zusammenschau mit den oben genannten Eigenschaften für eine herausragende Bedeutung des Aktin-Netzwerkes in der Biologie metastatischer Zellen spricht.

Actin Binding Proteins

Unter physiologischen Bedingungen aggregieren ATP-gebundene G-Aktin-Moleküle zu F-Aktin-Filamenten. Dabei bindet das ATP in den tiefen Spalt zwischen den beiden Hauptdomänen des G-Aktin-Moleküls und stabilisiert dadurch die Bindung zu weiteren G-Aktin-Molekülen, wodurch das dabei entstehende F-Aktin am wachsenden Ende (dem sogenannten Plus-Ende) aufrechterhalten wird. Durch interne Hydrolyse des ATP zu ADP wird das hintere Ende des F-Aktin-Filaments zunehmend instabil und G-Aktin dissoziiert (das sogenannte Minus-Ende). Dieses Phänomen wird als Tretmühlen-Mechanismus bezeichnet und findet unter physiologischen Bedingungen spontan statt. Die Geschwindigkeit dieses Mechanismus reicht jedoch nicht aus, um die Geschwindigkeit von migrierenden Zellen

hinreichend zu erklären – sogenannte actin binding proteins (ABP) interagieren mit Aktin und sind für die schnelle und gesteuerte Polymerisation des Netzwerkes verantwortlich (De La Cruz et al., 2000; Holmes et al., 1990; Pollard & Borisy, 2003). Im Folgenden wird ein Überblick über die bedeutendsten ABPs gegeben, welche die grundlegenden Eigenschaften der Aktin-Polymerisation steuern: Profilin, ADF/Cofilin, die Arp-Proteine, die capping-Proteine sowie die Familie der Formine.

Profilin

Der Großteil des unpolymerisierten Aktins liegt im Zytoplasma mit dem Plus-Ende an das kleine Protein Profilin gebunden vor, welches durch sterische Blockade die Filament-Elongation und -Nukleation selektiv am Plus-Ende blockiert (Pollard, 2016). Zudem kann Profilin-Aktin an die FH1FH2-Domäne von Forminen binden und beschleunigt die durch Formine gesteuerte F-Aktin-Polymerisation erheblich (Kovar, Harris, Mahaffy, Higgs, & Pollard, 2006).

ADF/Cofilin

Wirbeltiere besitzen die als ADF/Cofilin zusammengefassten aktin-depolymerisierenden Faktoren ADF (actin depolymerizing factor) und Cofilin-1/-2, von denen Cofilin-1 das am meisten verbreitete ist (Kanellos & Frame, 2016; Maciver & Hussey, 2002). ADF/Cofilin trennt Stränge vom Minus-Ende bereits bestehender F-Aktin-Filamenten ab, ohne die Rate der Depolymerisation zu beschleunigen; dadurch entstehen neue kleine Filamente mit freien Plus-Enden, die zur weiteren lokalen Verzweigung des

Aktin-Netzwerke verwendet werden können (Bravo-Cordero, Magalhaes, Eddy, Hodgson, & Condeelis, 2013).

Arp-Proteine

Der als Arp2/3-Komplex bezeichnete, unter Eukaryonten hochkonservierte Verbund aus sieben Polypeptiden ist in der Lage, ein neues Aktin-Filament in einem ungefähr 70° messenden Winkel an die Seite eines bestehenden Aktin-Filaments zu polymerisieren und so eine Verzweigung zu bilden (Campellone & Welch, 2010). Die direkte Kontrolle dieser Art der Aktin-Polymerisation erfolgt durch Proteine der Typ-1 NPF-Gruppe (nucleation-promoting factors), welche eine Koppelung zwischen Aktin-Monomeren und dem Arp2/3-Komplex bewirken und somit eine Nukleation begünstigen. Die Vertreter der Typ-1 NPF-Gruppe bestehen aus Proteinen der WASP-Familie (Wiskott-Aldrich syndrome protein), zu denen WASP, N-WASP (neural WASP), die drei Isoformen WAVE1-3 (WASP-family verprolin homologue), WASH, WHAMM und JMY gehören; die übergeordnete Steuerung dieser Proteine erfolgt größtenteils durch kleine Rho-GTPasen (Campellone & Welch, 2010; Rottner, Hänisch, & Campellone, 2010). Arp2/3-Komplexe finden sich in unmittelbarer Nähe des Teils der Zellmembran, der Lamellipodien formt, und es konnte eine entscheidende Rolle dieser Komplexe in der Formierung von Lamellipodien nachgewiesen werden, wobei der kleinen Rho-GTPase Rac eine bedeutende, übergeordnete Steuerungsfunktion zukommt (Goley & Welch, 2006). Eine Auswirkung von koexprimierten Arp2 und WAVE2 auf die Motilität von Tumorzellen wurde impliziert, da entsprechende pathologische Proben pulmonaler Adenokarzinome mit erhöhter Patientensterblichkeit und einer kürzeren erkrankungsfreien Zeit korreliert waren (Semba et al., 2006).

Formine

Die Familie der Formine ist gekennzeichnet durch zwei Formin-homology Domänen (FH), welche an deren C-Terminus lokalisiert sind. Über die FH1-Domäne kann Profilin-Aktin gebunden werden; die FH2-Domäne ist hochkonserviert und zusammen mit dem Linkerstück zur N-terminal benachbarten FH1-Domäne kritisch notwendig für die durch die Proteine vermittelte F-Aktin Polymerisation (Chesarone, Dupage, & Goode, 2010; Faix & Grosse, 2006). Aufgrund der Tatsache, dass die FH2-Domäne keine Aktin-Monomere binden kann, wurde vorgeschlagen, dass sie entstandene Dimere stabilisiert und dadurch eine weitere Nukleation kinetisch begünstigt (Pring, Evangelista, Boone, Yang, & Zigmond, 2003). Die FH2-Domäne bleibt am Plus-Ende des Filamentes gebunden und verdrängt das Capping-Protein, wodurch sehr lange Aktin-Filamente polymerisieren können (Faix & Grosse, 2006), wie es bei Arp2/3- oder Spire-vermittelten Nukleationen nicht der Fall ist.

Im Menschen sind 15 verschiedene Formine bekannt, die in einer Vielzahl von zellulären Funktionen wie der Zytokinese, der Formierung von Filopodien, Zelladhäsion und Motilität impliziert sind (Baarlink, Brandt, & Grosse, 2010). Mit Ausnahme von INF und delphinin sind die menschlichen Formine durch Autoinhibition blockiert, die durch intramolekulare Bindung der nahe der FH2-Domäne lokalisierten DAD-Region (dia autoregulatory domain) an die N-terminal der FH1-Domäne liegenden DID (diaphenous inhibitory domain) und damit verbundenen sterischen Blockade der FH2-Domäne ausgelöst wird. N-terminal der DID befindet sich eine Rho-binding domain (RBD), an die kleine Rho-GTPasen assoziieren und die autoinhibitorische DID-DAD Bindung auflösen können (Chesarone et al., 2010). Die Funktion langer Aktin-Filamente für motile Zellen und die

Tatsache, dass Formine an mechanischen Zellfunktionen wie der Ausbildung von Fokalen Adhäsionen beteiligt sind (Faix & Grosse, 2006), machen diese Familie der Aktin-Nukleatoren zu einem vielversprechenden Forschungsfeld in der Biologie migrierender Tumorzellen.

Spire

Der Aktin-Nukleator Spire bindet mit seinen vier WH2-Domänen an vier Aktin-Moleküle und bleibt am Minuspol gebunden, wodurch der entstehende singuläre Strang vor Disassemblierung am Minus-Pol geschützt bleibt (Baum & Kunda, 2005).

Capping-Protein

Das Capping-Protein ist ein Heterodimer aus zwei Untereinheiten, das sich an das freie Plus-Ende eines Aktin-Filaments binden und eine weitere Elongation verhindern kann. In Verbindung mit dem Arp2/3-Komplex können sich auf diese Weise kurze, dichte Netzwerke formen, wie sie beim kortikalen Aktin zu finden sind. Formine konkurrieren mit dem Capping-Protein um die Bindungsstelle und sind daher in der Lage, lange Aktin-Strukturen zu formen (Edwards et al., 2014).

1.2 Die zellkernständige Aktinfraktion

Beweise für nukleäres Aktin

Aktin assoziiert mit den drei eukaryontischen RNA-Polymerasen im Nukleus (Miyamoto & Gurdon, 2013; Percipalle, 2013) und ist essentieller Bestandteil der transkriptionellen Prä-Initialisierungskomplexe, wobei es als solches kritisch notwendig für eine korrekte Funktion der RNA-Polymerase II ist (Hofmann et al., 2004). Aktin assoziiert in engem Maße mit dem Chromatin-Remodelierungskomplex BAF (Brg or hBrm associated factors) und ist notwendig für dessen volle Funktion (Olave, Reck-Peterson, & Crabtree, 2002; Zhao et al., 1998); seitdem wurde Aktin als Bestandteil zahlreicher Chromatin-Remodelierungskomplexe identifiziert, was für eine weitreichende Funktion des Aktins im Nukleus als Ganzem spricht (Bettinger, Gilbert, & Amberg, 2004). Zwei Vertreter der Importin- β -Familie wurden als Transportproteine für Aktin identifiziert: Exportin-6 transportiert Aktin-Profilin-Komplexe aus dem Kernplasma in das Zytoplasma (Stüven, Hartmann, & Görlich, 2003) und Importin-9 importiert Aktin aus dem Zytoplasma in das Kernplasma (Dopie, Skarp, Kaisa Rajakyla, Tanhuanpaa, & Vartiainen, 2012).

Lange Zeit wurde angenommen, dass Aktin im Nukleus als Monomer auftritt, da in mehreren der oben genannten Komplexe Aktin-Monomer-bindende Proteine wie positive elongation factor b (pTEFb) und deoxyribonuclease I (DNaseI) gefunden wurden (Grosse & Vartiainen, 2013). Es war bekannt, dass der Transkriptionsfaktor MRTF (Myocardin related transcription factor) im Zuge der Serumantwort durch Bindung an G-Aktin in seiner subzellulären Lokalisation beeinflusst wird (Vartiainen, Guettler, Larijani, & Treisman, 2007); Untersuchungen zum genauen

Mechanismus dieses Effekts lieferten Evidenz, dass eine durch die Formine mDia1 (mammalian Diaphenous-related) und mDia2 gesteuerte Polymerisation von F-Aktin im Nukleus die Konzentration von lokalem G-Aktin beeinflusst und damit MRTF kontrolliert (Baarlink, Wang, & Grosse, 2013).

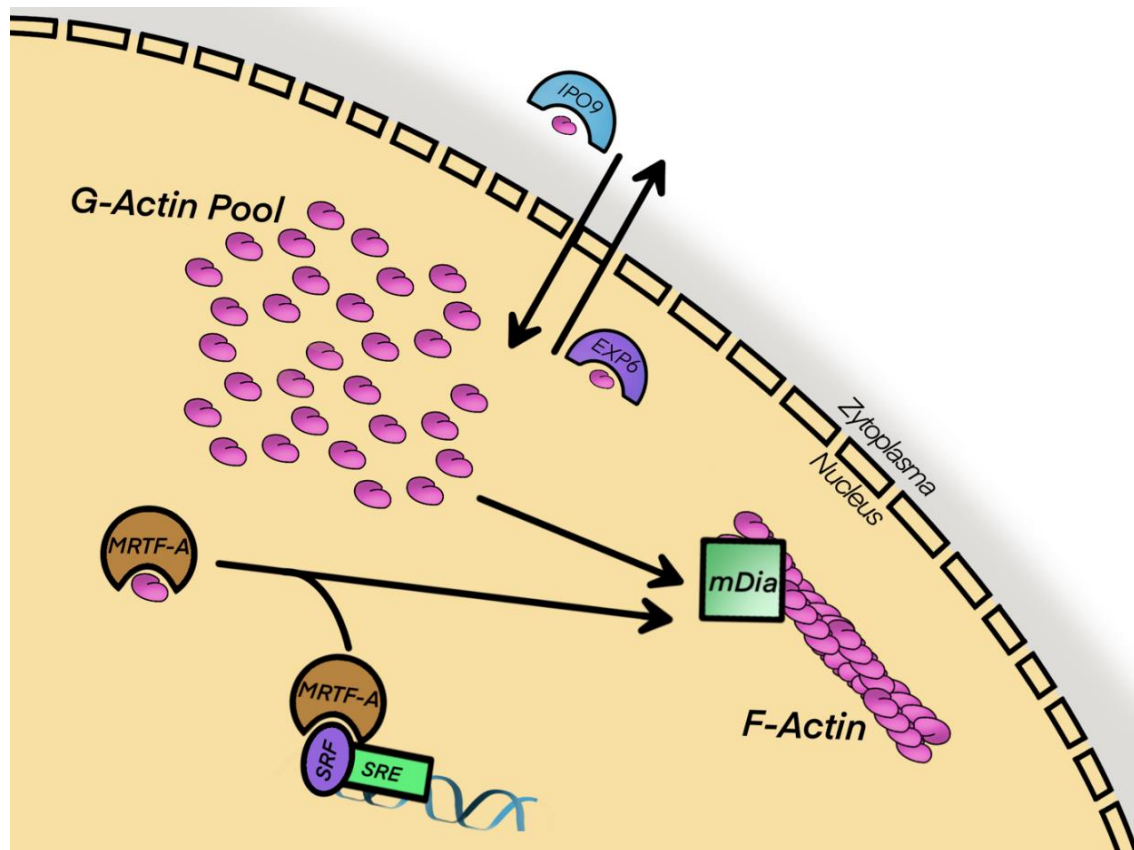


Abb. 1: Die Steuerung von MRTF-A/SRF durch nukleäres Aktin. Eigene Darstellung in Anlehnung an Grosse & Vartiainen (2013)

Die mikroskopische Darstellung des nukleären Aktins war lange Zeit nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich - eine Begebenheit, die sich in den letzten Jahren geändert hat. Phalloidin (ein fluoreszierendes, synthetisches Derivat von Phallotoxin) gilt als Goldstandard in der Darstellung von F-Aktin-Strukturen, kann aufgrund seiner Toxizität jedoch nur in fixierten Zellen verwendet werden - zudem wurde gezeigt, dass es die Struktur von F-Aktin-Filamenten ungewollt beeinflussen kann. Einzug in die neuere Forschung haben deshalb molekulare Sonden gefunden, die mit

fluoreszierenden Markern versehen wurden, sich an endogene Aktin-Strukturen anlagern und durch ihre geringe Größe die Bildung von Filamentstrukturen in deutlich geringerem Maße beeinflussen, wodurch auch eine Betrachtung von noch lebenden Zellen erfolgen kann. Ein häufig genutzter Farbstoff ist in diesem Zusammenhang das LifeAct-GFP, welches mithilfe eines nuclear localization signal (NLS) auch spezifisch im Zellkern exprimiert werden kann. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Konzentration des Farbstoffs erheblichen Einfluss auf das Polymerisationsverhalten des endogenen Aktins haben kann (Grosse & Vartiainen, 2013; Melak, Plessner, & Grosse, 2017). Durch Fusionierung eines NLS an den Actin-Chromobody-TagGFP der Firma ChromoTek konnte eine fluoreszierende molekulare Sonde gebildet werden, die mithilfe von nur einer Domäne an endogenes Aktin assoziiert und auch bei höheren Konzentrationen F-Aktin-Strukturen erkennt, ohne die Polymerisation zu stören (Plessner, Melak, Chinchilla, Baarlink, & Grosse, 2015). Durch diese Entwicklung und durch Einsatz hochauflösender Mikroskopiertechniken wie STORM und PALM konnten Bilder generiert werden, die unter bestimmten zellulären Bedingungen ein weitreichendes Aktin-Netzwerk im Kern zeigen (Baarlink et al., 2017).

Funktionen für nukleäres F-Aktin

Die Funktion von nukleärem F-Aktin ist im Gegensatz zum G-Aktin noch in geringem Maße erforscht, da erst in letzter Zeit geeignete Methoden zur Visualisierung dieser Strukturen entwickelt wurden. Wie bereits oben erwähnt konnte ein transienter Aufbau von F-Aktin durch die Formine mDia1 und mDia2 im Zuge der Serumantwort beobachtet werden, wobei in diesem Zusammenhang eine Steuerung des Transkriptionsfaktors MRTF

impliziert wurde. In einer weiteren Studie konnte eine nukleäre F-Aktin-Polymerisierung während der Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix gezeigt werden, welche zum Teil abhängig von der korrekten Funktion der Formine mDia1 und mDia2 war und eine nukleäre Lokalisation von MRTF-A nach sich zog, wobei MRTF-A an sich eine entscheidende Rolle bei der zellulären Adhäsion und Ausbreitung spielt (Medjkane, Perez-Sanchez, Gaggioli, Sahai, & Treisman, 2009). Notwendig für die Funktion dieses Signalweges war ein intakter LINC-Komplex (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton; eine mechanische Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der Kernmembran, siehe Abschnitt 1.4); in diesem Zusammenhang wird eine mechanische Koppelung zwischen dem in der Adhäsion befindlichen Zytoskelett und dem Feedback-Mechanismus durch nukleäre F-Aktin-Polymerisation und folgende MRTF-A-Sublokalisierung impliziert (Plessner et al., 2015). Da MRTF-A in Metastasenmodellen Auswirkungen auf die Motilität von Tumorzellen hat (Medjkane et al., 2009), ist dieser hier implizierte Signalweg zwischen der extrazellulären Matrix und der Formierung von nukleärem F-Aktin von tumorbiologischem Interesse.

Eine mechanische Funktion von nukleärem F-Aktin, wie man sie im Zytosol kennt, konnte beobachtet werden, als Aktinfilamente kurz nach der Mitose in Tochterzellen detektiert wurden, die sich in der G1-Phase befinden – es konnte gezeigt werden, dass eine korrekte Assemblierung dieser Strukturen und ein kontrollierter Abbau durch Cofilin-1 nach der Mitose notwendig für eine Expansion des Nukleusvolumens und Dekondensation des Chromatins sind (Baarlink et al., 2017). Zwei Studien konnten unabhängig voneinander zeigen, dass Arp2/3-vermittelte Formierung von F-Aktin im Nukleus eine Rolle bei der Reparatur von Heterochromatin-Schäden im Zuge des

homology-directed repair (HDR) spielt (Caridi et al., 2018; Schrank et al., 2018).

1.3 Die transkriptionelle Steuerung von SRF durch MRTF

Struktur und Funktion von SRF

Serum response factor (SRF) ist ein hochkonservierter Transkriptionsfaktor (Posern & Treisman, 2006), der an über 200 Zielgene bindet, welche sich durch die Ausprägung der sogenannten CarG-Box (CC(A/T)TATA(A/T)GG) auszeichnen (Cooper, Trinklein, Nguyen, & Myers, 2007). Als Co-Aktivatoren des SRF fungieren zum einen die MRTFs, welche über einen Rho-Actin-Signalweg in ihrem SRF-Bindeverhalten gesteuert werden (Miralles, Posern, Zaromytidou, & Treisman, 2003; Olson & Nordheim, 2010), und die Vertreter der TCF-Familie (ternary complex factors), die über MAP-Kinase (mitogen activated protein kinase) kontrolliert werden (Posern & Treisman, 2006); die beiden Co-Aktivator-Familien konkurrieren um die Bindungsstelle am SRF (Z. Wang et al., 2004).

Die SRF-Zielgene wurden nach Olson und Nordheim in Klasse I Zielgene eingeteilt, welche von SRF mithilfe durch MAP aktivierter TCF transkribiert werden und vor allem Proteine betreffen, welche den Übergang des Zellzyklus von G0 in G1 steuern. Klasse II Zielgene werden durch Rho-Actin vermittelte MRTF-Aktivität gesteuert und betreffen Proteine verschiedenster Funktionen, unter anderem Muskelkontraktion, die Dynamik des Aktinzytoskeletts an sich und Zellmotilität (Olson & Nordheim, 2010).

Die Zielsetzung dieser Arbeit umfasst vor allem Zellmotilität in Verbindung mit nukleärer Aktindynamik, weshalb der Fokus dieser Literaturschau auf durch MRTF-vermittelte SRF-Zielgene gerichtet wird.

MRTF-Zielgene

Myocardin-gesteuerte SRF-Aktivierung ist ein entscheidender Schritt der Differenzierung glatter Muskelzellen (Z. Wang, Wang, Pipes, & Olson, 2003) und im Wachstum skelettaler Muskeln (Li et al., 2005). Eine große Anzahl von Genen, welche das Aktinzytoskelett betreffen, werden von SRF kontrolliert; darunter fallen die Strukturgene für Aktin selbst und mehrere gut charakterisierte aktinmodulierende Proteine wie das ABP Cofilin-1 sowie Proteine, welche das Zytoskelett und die extrazelluläre Umgebung integrieren (Miano, Long, & Fujiwara, 2007).

Wie bereits erläutert wurde, konnte gezeigt werden, dass eine durch Formine angestoßene Aktin-Polymerisation im Nukleus eine Aktivierung von MRTF-A/SRF nach sich zieht, indem MRTF-A in den Nukleus lokalisiert (Baarlink et al., 2013; Vartiainen et al., 2007). MRTF-A besitzt durch zwei N-terminal lokalisierte RPEL-Domänen die Fähigkeit, monomeres Aktin zu binden, wodurch es primär zytosolisch lokalisiert und in seiner Funktion behindert wird, SRF zu aktivieren (Miralles et al., 2003). Nukleäre Aktin-Polymerisation verbraucht monomeres Aktin, wodurch die RPEL-Domänen mehrheitlich frei werden und MRTF-A in den Nukleus lokalisieren und SRF aktivieren kann. Diese Funktion wurde als Aktin-Monomer-Sensor beschrieben (Grosse & Vartiainen, 2013); unter Bedingungen niedriger Aktin-Monomer-Konzentrationen kann durch SRF eine Transkription von Aktin-betreffenden Genen angestoßen werden.

MRTF-SRF in Pathologien

Untersuchungen in zwei Tumorzelllinien haben ergeben, dass eine gestörte MRTF-A/SRF Funktion experimentell beobachtete Motilitätswerte und Adhäsion an die zelluläre Matrix verminderten, und in vivo beobachtete Tumorzellen zeigten in der Folge eine verminderte Koloniebildung. Die MRTF-A/SRF Funktion war zudem abhängig von einem funktionierenden Rho-Actin-Signalweg (Medjkane et al., 2009).

Invasionsstudien in MDA-MB-231 und HT1080 Zelllinien haben einen invasionssupprimierenden Effekt durch SCAI (Suppressor of Cancer Cell Invasion) gezeigt, der mit MRTF-A im Kern assoziiert und vor allem die durch MRTF-A/SRF gesteuerte β 1-Integrin Transkription hemmt. Es konnte gezeigt werden, dass ein RNA-vermittelter Knockout von SCAI zu verstärkter experimenteller Tumorinvasion führte, was für einen invasionssupprimierenden Effekt von SCAI und ein invasionsförderndes Potential von MRTF-A/SRF spricht (Brandt et al., 2009).

1.4 Das Kernnetzwerk und der LINC-Komplex

Das Kernnetzwerk

Der Zellkern wird von einer Kernhülle umfasst, deren Bestandteile zwei aufeinanderliegende Phospholipid-Doppelschichten (inner nuclear membrane, outer nuclear membrane; INM, ONM) und ein dichtes Netzwerk spezialisierter Intermediärfilamente unterhalb der INM sind (Zwerger, Ho, & Lammerding, 2011). Diese spezialisierten Intermediärfilamente sind bekannt als die Lamine A, B und C und dimerisieren zu linearen Polymeren, welche mit Ausnahme des Nukleolus im gesamten Kern zu finden sind und

unterhalb der INM eine als nukleäre Lamina bezeichnete Schicht bilden (Ho & Lammerding, 2012). Lamine sind zudem wesentlicher Bestandteil eines mechanischen und gering untersuchten Netzwerkes, das als Kernskelett bezeichnet wird und zusätzlich NuMA (nuclear mitotic apparatus), Spektrine, Titin, Aktin und verschiedenste Formen von Myosin enthält. Das Kernskelett führt zu einer außerordentlichen Stabilität des Zellkerns - seine gemessene Stabilität ist fünf- bis zehnfach höher als die des Zytoskeletts; zudem ist es involviert in die Organisation und Transkription des Genoms (Simon & Wilson, 2011).

Die Komplexität und Bedeutung der Kernhülle in der Physiologie der Zelle wird deutlich, wenn die Fülle an pathologischen Erscheinungen betrachtet wird, die aus mutierten Kernhüllenproteinen entstehen kann. Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD), eine erbliche muskuläre Dystrophie, wurde als erste Krankheit erkannt, die durch mutierte Kernhüllenproteine ausgelöst wird, welches im Falle der EDMD ein defektes Emerin (kodiert auf STA1) oder ein spezifisch mutiertes LMNA sein kann, das für die Lamine A und C kodiert (Rankin & Ellard, 2006). Seitdem wurden weitere, nun als Laminopathien bezeichnete Erkrankungsbilder identifiziert, welche von defekten Laminen herrühren, wobei der Großteil auf LMNA zurückzuführen ist; zu diesen Erkrankungsbildern gehören unter anderem die Gliedergürteldystrophie (Limb-girdle muscular dystrophy LGMD) und das prämaturrelle Alterungssyndrom HGPS (Hutchinson-Gilford progeria syndrome) (Zwerger et al., 2011).

Struktur des LINC-Komplex

Der Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) Komplex stellt die mechanische Verbindung zwischen dem Kernskelett und dem Zytoskelett dar und ist in der Kernmembran lokalisiert. In der ONM befinden sich

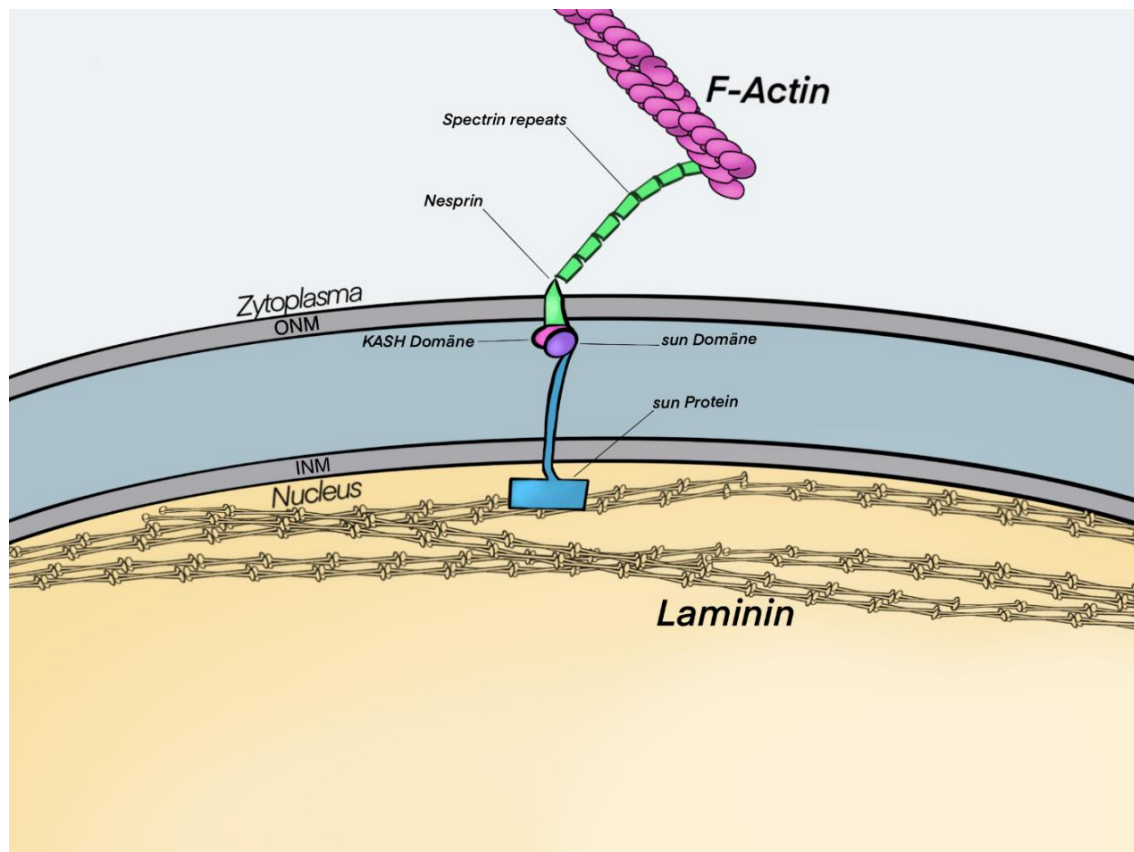


Abb. 2: Vereinfachte Struktur des LINC-Komplex an der Kernhülle. Eigene Darstellung in Anlehnung an Chang et al. (2015)

Proteine der Gruppe der Nesprine (nuclear envelope spectrin repeat protein), welche sich durch eine KASH-Domäne (Klarsicht, ANC-1, Syne Homology) auszeichnen, die von der zytoplasmatischen Seite des Nesprins bis in den perinukleären Spalt zwischen ONM und INM reichen und dort sowohl über multiple nichtkovalente Verbindungen wie auch Disulfidbrücken an SUN-Domänen (Sad1 and UNC-84) entsprechender Proteine binden, welche an der INM über Verbindungen zu Laminen und anderen Kernskelett-Proteinen befestigt sind. KASH-Proteine reichen über sogenannte Spectrin Repeat (SR) Domänen in das Zytosol und binden über

gepaarte Calponin Homology (CH) Domänen an Aktin-Filamente, womit Teile des Zytoskeletts an die Kernmembran gekoppelt werden; einige KASH-Proteine besitzen auch die Fähigkeit, Mikrotubuli oder Intermediärfilamente zu binden (Chang, Worman, & Gundersen, 2015).

Mechanotransduktion

Die Funktion des LINC-Komplex als mechanotransduktorische Einheit ist seit kurzem bekannt, wobei seine Bedeutung in vielen, zum Teil wenig erforschten Funktionen liegt. Ein intakter LINC-Komplex ist Voraussetzung für eine mechanische Koppelung des Kerns mit dem Rest der Zelle; so führt ein defekter LINC-Komplex dazu, dass durch Mikroinstrumente verursachte Bewegungen der Zellwand nicht mehr auf den Kern übertragen werden können, wobei sich dieser unter normalen Bedingungen mitbewegt (Lombardi et al., 2011). Die Geschwindigkeit der spontanen Migration von Fibroblastenzellen in einer 3D-Matrix wird durch einen defekten LINC-Komplex herabgesetzt, wodurch eine entscheidende Rolle des LINC-Komplexes in der Migration deutlich wird (Khatau et al., 2012). Während der Adhäsion und Ausbreitung von Fibroblastenzellen kann eine Integrin-abhängige nukleäre Aktinpolymerisation beobachtet werden, die über MRTF-A zu einer SRF-Transkription führt, wobei dieser Vorgang abhängig vom LINC-Komplex ist (Plessner et al., 2015). Mikrobewegungen der Zellwand führen über Mechanotransduktion in den Kern zu Bewegungen des Chromatins, was als Schutzreaktion eine transkriptionelle Hochregulierung von DHFR (Dihydrofolatreduktase) nach sich zieht; dieser Mechanismus ist abhängig von einem funktionierenden LINC-Komplex und einer intakten Zellkernhülle (Tajik et al., 2016).

1.5 Integrin-vermittelte Dynamik des Aktin-Zytoskeletts

Die Integrine sind als membrandurchspannende Rezeptoren die maßgeblichen Verbindungsstücke zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett, wodurch sie entscheidende Rollen bei der Zelladhäsion, Migration, Embryologie, der Aufrechterhaltung von Zellverbänden und der Hämostase spielen (Harburger & Calderwood, 2009); der Komplex aus Integrinen und zusätzlich assemblierten Hilfsproteinen an einem Zelladhäsions-Punkt wird auch als Adhäsom bezeichnet (Schiller & Fässler, 2013).

Struktur der Integrine

Integrine setzen sich aus je zwei nichtkovalent assoziierten Subgruppen zusammen: 18 verschiedene α -Gruppen und 8 β -Gruppen können 24 unterschiedliche Integrine formen, welche spezifische Bindungsaffinitäten aufweisen. Jede Subgruppe besitzt eine membrandurchspannende Helix und eine zumeist kurze zytoplasmatische Domäne, während der Großteil des Proteins als Ektodomäne außerhalb der Zelle lokalisiert ist (Campbell & Humphries, 2011). Die Bindungsstellen für die extrazellulären Matrixproteine finden sich entweder auf beiden Subgruppen - wie im Falle des RGD-Motives, welches sich beim extrazellulärem Fibronectin wiederfindet und von Domänen beider Subgruppen erkannt wird - oder nur auf der α -Subgruppe (Kechagia et al., 2019).

Integrin-Aktivierung und das Adhäsom

Unter Ruhekonditionen befinden sich die Integrine an der Zelloberfläche in einer inaktivierten, gekrümmten Konformation, die keine feste Bindung zur extrazellulären Matrix zulässt und sich erst durch mechanische Kraft oder

biochemische Signale aus dem Zytosol auflöst, wodurch die Integrine ihre aktivierte Form einnehmen. Das große Zytosolprotein Talin bindet F-Aktin-Filamente an die zytoplasmatische Domäne der β -Integrine, womit sich eine Konformationsänderung sowohl der α - als auch β -Subgruppen ergibt, die extrazellulären Anteile sich aufrichten und bindungsaffiner werden. Ein weiterer wichtiger Aktivator ist Kindlin, das ebenfalls an β -Integrine bindet und über Paxilin eine subsequente Aktivierung von Rac1 erwirkt, um damit lokal das Aktinzytoskelett auszubauen. Diese Aktivierung kann auch durch externe mechanische Kräfte ausgelöst werden, indem Liganden, zunächst schwach an die inaktiven Integrine gebunden, durch Zug mechanischen Stress auf die extrazellulären Domänen der Integrine ausüben und sie damit physisch von der inaktiv gekrümmten in die aktive, aufrechte Form ziehen. Das Aktinzytoskelett und der Extrazellulärraum sind als eigenständige Systeme somit über die Integrine und Adapterproteine mechanisch gekoppelt, wodurch eine Kraftübertragung in beide Richtungen stattfinden kann (Kechagia et al., 2019).

Entstehende Integrin-Extrazellulär-Kontakte werden als NA (nascent adhesions) bezeichnet und lösen sich zumeist schnell wieder auf, können sich jedoch unter steter Bindung und Rekrutierung des Aktinzytoskeletts, unter anderem vermittelt durch FAK (focal adhesion kinase), zu reifen FA (focal adhesions) entwickeln, die eine feste, mechanosensitive Koppelung an die extrazelluläre Matrix und die Ausbildung von Lamellipodien ermöglichen (Sun, Guo, & Fässler, 2016). Für das Fibronectin-bindende $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin konnte gezeigt werden, dass mechanische Kraft alleine die Phosphorylierung des Downstream-Effektors FAK auslöst (Friedland, Lee, & Boettiger, 2009).

Die Kraft, die sich auf Integrin-Komplexe ausübt, führt in jedem Fall zur Rekrutierung von Folgeproteinen und einem Ausbau des Aktinzytoskeletts, weshalb man bei diesen adhäsiven Komplexen auch von Mechanosensoren spricht. Durch Aktinpolymerisierung und mechanischen Zug an F-Aktin-Polymeren, gehören zu den Downstream-Effektoren dieser Mechanosensoren auch das aktinabhängige MRTF-A-Shuttling und der LINC-Komplex (Kechagia et al., 2019).

Integrine in der Invasion

Aufgrund ihrer mechanischen Bedeutung für die Zelle werden für Integrine essentielle Funktionen der Tumorzellmigration und -invasion postuliert. Eine durch MRTF-A/SRF und SCAI vermittelte Kontrolle der $\beta 1$ -Integrin-Expression hatte Auswirkungen auf das invasive Verhalten von Tumorzellen, wobei eine erhöhte $\beta 1$ -Integrin-Expression mit höheren Invasionsraten einherging (Brandt et al., 2009). Tumorzellen mit erhöhter Expression von $\alpha 5\beta 1$ - oder $\alpha V\beta 3$ -Integrinen zeigten eine verstärkte Lokalisation von MRTF-A im Zellkern bei Bindung von Fibronectin (Hermann et al., 2016).

Hochregulierte Integrin-Expression wurde als korrelierender Faktor vieler invasiver Tumorerkrankungen erkannt, und es wurden zahlreiche Medikamentenstudien durchgeführt, die eine Integrin-Blockade zum Ziel hatten (Desgrosellier & Cheresch, 2010), jedoch noch keine vollständig überzeugenden Ergebnisse erbrachten (Hamidi, Pietila, & Ivaska, 2016).

1.6 Die unmittelbare extrazelluläre Umgebung

Die extrazelluläre Matrix (extracellular matrix; ECM) besteht aus über 300 bekannten Proteinen und sorgt für die strukturelle Aufrechterhaltung von Zellverbänden und schlussendlich Organstrukturen, indem es als Bindegewebe zwischen den Zellen liegt und über Membranstrukturen wie Integrine an diese gebunden ist; es wird weiterhin zwischen dem interstitiellen Bindegewebe und der Basalmembran unterschieden, die eine spezialisierte ECM darstellt und das Epithel vom darunterliegenden Organstroma abgrenzt (Bonnans, Chou, & Werb, 2014).

Struktureller Hauptbestandteil der ECM sind die Kollagene, welche sich durch eine sich wiederholende Struktur eines Triplets auszeichnen, bei dem es sich in den meisten Fällen um Glycin-Prolin-(4-Hydroxyprolin) handelt; die Kollagene formen durch stabile Quervernetzungen ein rigides dreidimensionales Netzwerk. Weitere bedeutende Bestandteile der ECM sind Proteoglykane und Glykoproteine (Hynes & Naba, 2012). Zu den Glykoproteinen gehören unter anderem die Gruppe der Laminine, welche Bestandteil der Basalmembran sind (Aumailley et al., 2005) und die Fibronectine.

Die Fibronectine als Familie entstehen durch alternatives Splicing eines einzigen transkribierten Gens und sind ubiquitär in der ECM der meisten Organstrukturen zu finden; die Proteine sind an umliegende Kollagenfasern und durch multiple Querverbindungen untereinander verbunden sowie über ihre RGD-Domäne, bzw. CS1-Sequenz an die Integrine der sie umgebenden Zellen gekoppelt, wobei sie eine regulierende Signalfunktion für Adhäsion, Migration und Differenzierung aufweisen; dieser Funktion entsprechend fördert die Bindung von Integrinen an Fibronectin die

Ausbildung von Adhäsionskomplexen (Pankov & Yamada, 2002; Schwarzbauer & DeSimone, 2011).

Die Erforschung der Tumor-Mikroumgebung (tumor microenvironment) ist ein relativ neues Gebiet der Tumobiologie, die sich mit der veränderten ECM von Tumorzellen befasst; so spielen eine durch Tumorzellen versteifte oder mittels Fibronectin-Sezernierung veränderte Zusammensetzung der ECM eine wichtige Rolle bei der Migration und Invasion metastasierender Zellen, wobei eine aktive Remodelierung zu veränderten Adhäsionseigenschaften führt, die den Modus der Invasion beeinflussen können (Bonnans et al., 2014; Charras & Sahai, 2014; Hamidi & Ivaska, 2018).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie in unserem Labor bereits gezeigt werden konnte (Plessner et al., 2015), kann Fibronectin-Bindung während der Adhäsion von murinen Fibroblastenzellen an $\alpha 5\beta 1$ -Integrine eine Signalkaskade auslösen, die zu einer nukleären Aktinpolymerisation und MRTF-A-Sublokalisierung in den Zellkern führt, die abhängig von einem funktionierendem LINC-Komplex war. Ob dieser Mechanismus auch in invadierenden humanen Tumorzellen von Bedeutung ist, war Forschungsgegenstand dieser Doktorarbeit.

Für ein integriertes Verständnis sollte ein Invasionassay konzipiert werden, mithilfe dessen über Live-Mikroskopie die Migrationseigenschaften von humanen Fibrosarkomzellen (HT1080) unter verschiedenen Bedingungen untersucht wurden; hierbei wurden zum einen Bedingungen zur Unterbindung der nukleären Aktindynamik und zum anderen eine Methode zur Blockierung des LINC-Komplexes verwendet.

Mithilfe hochauflösender konfokaler Live-Mikroskopie sollten subzelluläre Eigenschaften der Fibrosarkomzellen untersucht werden, wie die Shuttling-Dynamik von MRTF-A unter Fibronectin-Bindung und migratorischem Verhalten oder die Polymerisierung von nukleärem Aktin während der Invasion.

Auf diese Weise lässt sich ein umfassendes Bild von der Integrin-LINC-nuclear-Actin-MRTF-A Signalkaskade in invadierenden Tumorzellen zeichnen.

2. Material

2.1 Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Medium	Ursprung
HEK293T	H. Sapiens	DMEM	embryonale Nierenzellen
HT1080	H. Sapiens	DMEM	Fibrosarkom

2.2 Materialien für die Zellkultur

Materialbenennung	Hersteller
Bovines Kollagen Typ 1 6,41 mg/ml	Sigma-Aldrich
Bovines Kollagen Typ 1-FITC 1 mg/ml	Sigma-Aldrich
DMEM	Capricorn
Doxycyclin	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	Roth
FCS	Capricorn
Formaldehyd 37%	Roth
G418	Capricorn
Lipofectamine LTX	ThermoFischer Scientific
OptiMEM	ThermoFischer Scientific
Parafilm	Bermis Company
PBS	Capricorn
Penicillin/Streptomycin 100x	Capricorn
Platten und Gefäße	Sarstedt
Puromycin	Invitrogen
Trypsin-EDTA in PBS 0,05%	Capricorn
µ-Slides und µ-Wells	Ibidi

2.3 Substanzen, Reagenzien und Enzyme

Materialbenennung	Hersteller
2x BBS Transfektionspuffer: <ul style="list-style-type: none">- 0,05 M BES- 0,28 M NaCl- 1,5mM Na₂HPO₄	Sigma-Aldrich
4B4 Antikörper	Beckmann-Coulter
CaCl ₂ -Pulver zur Auflösung	Roth
CMFDA	ThermoFischer Scientific
Fibronectin	Sigma-Aldrich
NaOH	Roth
SNAP-Dye 647-SiR	New England Biolabs
Unspezifische IgG Antikörper	CellSignaling

2.4 Plasmide

Plasmid	Publikation / Hersteller
paRac1	Wu et al., 2009
pEF-GFP	Baarlink et al., 2017
pEF-XPO6-GFP	Baarlink et al., 2017
pInd20-MRTF-A-GFP	Miralles et al., 2003
pInd20-Puro-BFP-NLS-actin-R62D	Baarlink et al., 2017
pInd20-Puro-NLS-BFP	Baarlink et al., 2017
psPAX2 und pMDG.2	J. Swiercz, Max-Planck-Institut in Bad Nauheim
pWPXL-nAC-mCherry	Baarlink et al., 2013
pWPXL-nAC-SNAP	Baarlink et al., 2017
tagRFP	Plessner et al., 2015
tagRFP-dn.KASH	Plessner et al., 2015

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Kultur und Passagierung

HT1080-Zellen wurden in DMEM Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (DMEM-FCS) in einem Zellinkubator bei 37° C und einer wassergesättigten 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Kulturgefäße wurden bis 80-90% Konfluität gehalten und dann passagiert. Nach etwa 25 Passagen wurde die Population verworfen und ein neues Aliquot aus der Kryokultur aufgetaut, welches entweder in einem -80° C Gefrierschrank, oder zur längeren Instandhaltung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurde. Die Arbeiten in der Zellkultur wurden unter einer Werkbank ausgeführt, welche sterile Bedingungen ermöglichte.

Zur Passagierung wurde ein Kulturgefäß mit 80-90% Konfluität zunächst für etwa eine Minute mit 37° C warmem PBS gewaschen, um das DMEM-FCS zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation für 3 Minuten mit 10% Trypsin/EDTA, wobei je nach Gefäßgröße 1-3ml verwendet wurden. Es erfolgte dann die Zugabe von DMEM-FCS, wobei das zugegebene Volumen mindestens dem Doppelten des Trypsin/EDTA entsprach. Durch vorsichtiges Pipettieren wurden die abgelösten Zellen in Suspension gebracht und die Anzahl der Zellen in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Das endgültige Volumen wurde entsprechend der gewünschten Zieldichte fraktioniert und auf neue Kulturgefäße verteilt.

Vor Experimenten, die eine Serumstarvation erfordern, wurde das Kulturgefäß bis etwa 70% Konfluität kultiviert, mit PBS gewaschen und anschließend FCS-freies DMEM hinzugegeben. Das Experiment erfolgte

dann am nächsten Tag. Zur Zellablösung wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA und FCS-freiem DMEM suspendiert. Die Suspension wurde danach zur Deaktivierung des Trypsins zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in FCS-freiem DMEM oder entsprechend den Experimentkonditionen aufgenommen.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen passagiert, die Zellsuspension fraktioniert und bei 900 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets wurden dann in DMEM-FCS mit 5% DMSO aufgenommen und unverzüglich in den -80° C Gefrierschrank überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem 37° C warmen Wasserbad aufgewärmt und in ein neues Kulturgefäß überführt.

Transfektion von genetischem Material mittels Lipofectamine LTX

Zur transienten Protein-Expression wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine LTX verwendet. Hierzu wurde eine 6-Well mit 70% konfluenten HT1080-Zielzellen mit einem Reaktionsansatz aus 2,5 µg DNA, 3,75 µl LTX-Reagenz, 2,5 µl Plus-Reagenz und 500 µl OptiMEM versehen, welcher zuvor 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Das Experiment erfolgte 16-24 Stunden nach Transfektion.

Transfektion von genetischem Material mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation zur Generierung von Viruspartikeln

Zur Generierung von Viruspartikeln für die lentivirale Transfektion wurden im BSL-2 Bereich des Labors 10 cm-Schalen mit 50% konfluenten HEK293T-Zellen mittels der Kalzium-Phosphat-Präzipitation mit der gewünschten Ziel-DNA und viralen Verpackungsplasmiden transfeziert. Hierzu wurden je 1 µg der viralen Verpackungsplasmide psPAX2 und pMDG.2 sowie 8 µg der

Ziel-DNA mit doppelt-destilliertem Wasser auf 438 µl aufgefüllt. Es wurden dann 62 µl 2M CaCl₂ hinzugegeben und der Ansatz mit 500 µl 2xBBS aufgefüllt und vorsichtig durchmischt. Der Ansatz wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann tröpfchenweise auf die Zielzellen gegeben. 4-6 Stunden nach Hinzugabe wurde das Präzipitat unter dem Durchlichtmikroskop kontrolliert und bei positiver Identifikation das Zellmedium ausgetauscht. Die Inkubation der Zellen erfolgte dann für weitere 2 Tage zur Generierung Virus-enthaltenden Mediumüberstandes.

Arbeit mit stabil-exprimierenden Zelllinien

Stabil exprimierende Zelllinien besitzen dauerhaft in das Genom integrierte lentivirale Expressionsvektoren, welche eine gleichbleibende und homogene Proteinexpression ermöglichen. Zusätzlich wurden für einige Zelllinien induzierbare Expressionsvektoren transfeziert, wobei das pINDUCER20-System genutzt wurde (Meerbrey et al., 2011), welches eine selektive Expression des genetischen Materials durch Hinzugabe von Doxycylin in die Zellkultur erlaubt. Das pINDUCER20-System exprimiert zusätzlich eine Geneticin-Resistenz, wodurch positiv transfezierte Zellen in der Kultur durch Hinzugabe von Geneticin (G418) selektiert werden können, damit ein homogenes Expressionsniveau innerhalb der Population erreicht wird; eine modifizierte Version mit Puromycin-Resistenz wurde ebenfalls verwendet. Die Etablierung einer homogenen Zellpopulation mit nicht-induzierbaren, fluoreszierenden Konstrukten erfolgte über eine FACS-Sortierung der positiven Zellen im Biomedizinischen Forschungszentrum der Philipps-Universität.

Zur Generierung der stabilen Zelllinien wurde Virus-enthaltender Überstand einer transfezierten HEK293T-Kultur in das Zellkulturmedium

der HT1080 Zielzellen gegeben, wobei von einer 10cm-Schale der HEK293T-Kultur etwa 1-1,5 ml Medium in eine 6-Well der Zielkultur überführt wurde. Nach zwei Tagen Inkubation wurden die Zielzellen passagiert und je nach Konstrukt, wie oben erwähnt, selektiert. Es erfolgten mindestens 5 Passagen der Zielzellen, ehe diese aus dem BSL-2 Bereich wieder in den BSL-1 Bereich des Labors überführt wurden.

Zur Vorbereitung von Experimenten, die eine Aktivierung eines Doxycyclin-induzierbaren Promoters erforderten, wurde am Vorabend des Experimentes 1 µg/ml Doxycyclin in das Zellmedium gegeben.

3.2 Mikroskopie

Die Auswertung der Experimente erfolgte primär an einem konfokalen LASER-Raster-Mikroskop LSM800 der Firma Zeiss. Zur Vergrößerung wurden Öl-Objektive mit 63x- oder 40x-Verstärkung verwendet.

Für die Lebendzellmikroskopie wurde eine Inkubationskammer derselben Firma eingesetzt, welches die Mikroskopie in einer konstanten 37° C warmen, wassergesättigten 5% CO₂-Atmosphäre ermöglichte.

Die Sichtung der Aufnahmen und weitere Bearbeitung erfolgte mit dem Open-Source Softwarepaket ImageJ (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012).

3.3 Methoden zur Beobachtung von nukleär-zytosolischem Proteinshuttling

Zur Beobachtung des Shuttling-Verhaltens von MRTF-A-GFP wurden HT1080 mit stabil exprimierendem nAC-mCherry und stabil exprimierenden, induzierbaren pINDUCER20-MRTF-A-GFP Konstrukten in μ -Slides der Firma ibidi ausgesät; bei etwa 70% Konfluität wurde das DMEM-FCS entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen, und es wurde serumfreies DMEM mit 1 μ g/ml Doxycyclin hinzugegeben. 16-24 Stunden später erfolgte das Experiment im Mikroskop unter Lebendzell-Bedingungen. Das Medium eines Wells wurde gegen serumfreies Medium mit 120 μ g/ml Fibronectin ausgetauscht, als Kontrolle erfolgte in einem anderen Well der Austausch mit serumfreiem Medium, wodurch der Prozess des Medium-Austausches als Confounder entfernt wird.

Zur Quantifizierung des Shuttlingverhaltens wurden HT1080 mit stabil exprimierenden und induzierbaren pINDUCER20-MRTF-A-GFP Konstrukten auf dieselbe Weise auf autoklavierte 18 mm-Deckgläser in einer 6-Well ausgesät und mit Doxycyclin behandelt. Zum Experimentzeitpunkt erfolgte der Austausch des Mediums gemäß den oben genannten Experimentbedingungen in der Zellkultur. Nach 45 Minuten Inkubationszeit im Inkubator wurden die Zellen für 15 Minuten mit 5% Formaldehyd fixiert und auf Glas-Objektträger übertragen. Es erfolgte die Auswertung am Mikroskop.

3.4 Methoden zur Beobachtung von Tumorzellinvasion

Experimente zur Beobachtung von Tumorzellinvasion in eine Kollagen-Matrix wurden in μ -Slides VI 0,4 der Firma ibidi durchgeführt. Diese weisen pro Objektträger sechs Einheiten auf, die je aus einem zentralen 0,4 mm hohen Kanal bestehen und an jedem Ende Reservoir aufweisen, welche 30 μ l Volumen aufnehmen können. Das Material der μ -Slides ist O₂- und CO₂-permeabel.

Die Vorbereitung des Kollagen-Gels erfolgte unter gekühlten Bedingungen auf einem Eisbett, um vorzeitige Solidifizierungen zu verhindern. 436 μ l serumfreies DMEM wurden vorsichtig mit 160 μ l Kollagen Typ 1 (boviner Ursprung; 6,41 mg/ml) gemischt und mit entsprechender Menge an 1M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 titriert, wobei pH-Messstreifen verwendet wurden. Von den 600 μ l wurden 300 μ l mit 22,5 μ g/ml Fibronectin vermischt und die Kanäle der μ -Slides mit je 60 μ l gefüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen entstanden.

Zur Darstellung von Kollagenfasern mithilfe von FITC-Kollagen, wurden 386 μ l serumfreies DMEM mit 40 μ l FITC-Kollagen (boviner Ursprung; 1 mg/ml) und 160 μ l Kollagen Typ 1 (boviner Ursprung; 6,41 mg/ml) vermischt und in einem mit Eiswasser gekühltem Ultraschallbad 5 Minuten lang homogenisiert. Der weitere Ablauf entspricht dem hier bereits beschriebenen.

Die für das Experiment vorbereiteten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mithilfe von 10% Trypsin/EDTA gelöst, eine Probe in der Neubauer-Kammer gezählt und die Suspension zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde entsprechend der Zählung in das Fibronectin-freie Kollagen-Gel aufgenommen, sodass eine Zellkonzentration von 500.000 Zellen/ml

erreicht wurde. 7,5 μ l der Zell-in-Kollagen Suspension wurden durch das Reservoir der μ -Slides in das A-Ende des Kanals (**Abb. 3**) gegeben, wobei eine konische und homogene Zellansammlung entstand. Die μ -Slides wurden je nach Experimentkondition präpariert und für 20 Minuten im Zellinkubator bis zur Gel-Solidifizierung gehalten.

Nach Solidifizierung des Gels wurde die A-Seite mit 30 μ l serumfreiem Medium und die B-Seite mit 20% FCS enthaltendem Medium aufgefüllt. Die Reservoirs wurden mit Parafilm abgedichtet und die μ -Slides in die Inkubationskammer überführt. Es erfolgte eine Ablichtung der Zellfront mit mehreren, nebeneinander liegenden Abbildungskacheln. Es erfolgte zur Minimierung der Phototoxizität die Aufnahme einer z-Ebene, welche mithilfe des Autofokus gehalten wurde. Über einen Zeitraum von mindesten 12-18 Stunden erfolgte alle 7,5-Minuten automatisiert eine Aufnahme.

Die Auswertung der Invasionsexperimente erfolgte mittels des Manual Tracking Tools im ImageJ-Softwarepaket. Zur quantitativen Auswertung wurden alle im ersten Bild sichtbaren Zellen manuell verfolgt, wobei eine Verfolgung abgebrochen wurde, sobald die Zelle Zeichen von Apoptose zeigte oder sie nur <50% der Experimentzeit verfolgbar war.

Die Track-Daten wurden mithilfe des Chemotaxis and Migration Tools der Firma ibidi statistisch ausgewertet. Es wurden hierbei die durchschnittliche Geschwindigkeit, die Direktionalität und der Forward Migration Index (FMI) bestimmt, sowie ein Rayleigh-Test durchgeführt (siehe 3.5).

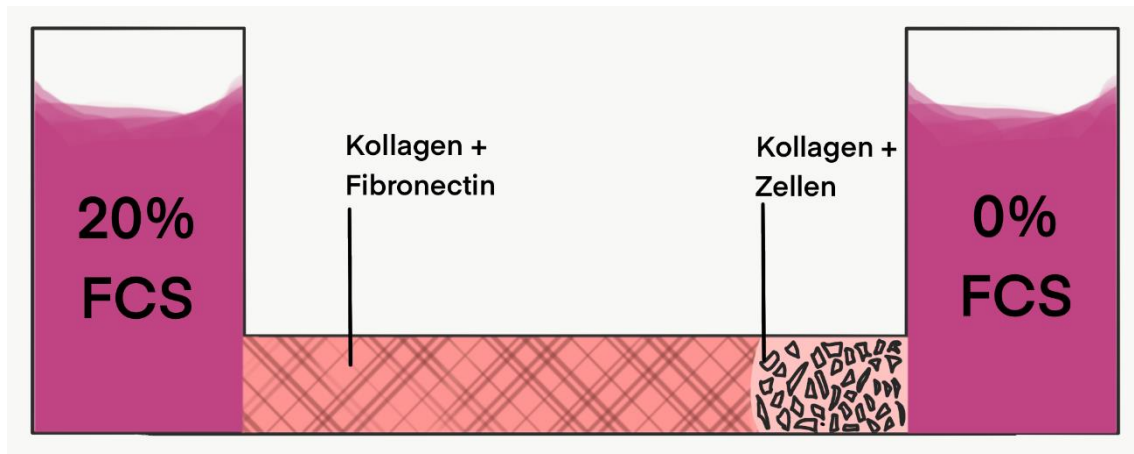


Abb. 3 Schematische Darstellung des Invasionsassays

3.5 Statistik

Student's t-test und Varianzanalyse

Als Hypothesentest wurde ein ungepaarter zweiseitiger Test verwendet. Er basiert auf der Student-t-Verteilung, die auch kurz t-Verteilung genannt wird. Die Nullhypothese wurde gegen die Alternativhypothese getestet. Sofern die Nullhypothese verworfen wird, spricht man von einem signifikanten Ergebnis. Alle Werte, die zur Verwerfung der Nullhypothese führen, werden als Ablehnungsbereich bezeichnet. Es gilt: $\alpha = 1 - P\%$. Das Alpha gibt den Fehler 1. Art an, d.h. man lehnt die Nullhypothese ab, obwohl sie richtig ist. In der vorliegenden Arbeit wurde $\alpha = 5\%$ gewählt. Zudem wurde geprüft, bis zu welchem Niveau die Ergebnisse als signifikant betrachtet werden können. Die Irrtumswahrscheinlichkeit oder das Signifikanzniveau von α ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Fehler 1. Art

begangen wird. Das Konfidenzniveau bestimmt man: $P\% = 1 - \alpha$. Die Werte stammen aus drei biologisch unabhängigen Experimenten, wobei jeweils zwei Konditionen miteinander verglichen wurden. Jede Kondition umfasst ungefähr gleich viele Zellen. Die Zählobjekte (X_i) sind unabhängige identische (μ, σ^2)-normalverteilte Zufallsvariablen der Stichprobe.

Zur Prüfung zweier Faktoren auf eine Variable wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt.

Da es sich um eine vergleichsweise kleine Stichprobe handelt, sind alle Ergebnisse der Hypothesentests lediglich als Hinweise zu sehen, die die Hypothesen statistisch untermauern könnten. Die Berechnung des Student's t-test und der zweifaktoriellen Varianzanalyse erfolgte mithilfe der Statistiksoftware Prism 8 (GraphPad).

Rayleigh-Test

Im Rahmen der Dissertation wird ein weiterer Hypothesentest verwendet; dieser Test basiert auf der Rayleigh-Verteilung, welcher die Verteilung von Punkten auf einem Kreis hinsichtlich der Homogenität prüft (Betragsverteilung 2. Art). Hierbei wird geprüft, bis zu welchem Niveau die Signifikanz der Ergebnisse vermutet werden kann. Moore (1980) empfiehlt eine Modifikation des Rayleigh-Tests für gewichtete Vektordaten. Er ist sensitiv gegenüber einer nicht zufällig-verteilten Konzentration oder Streuung von Vektorwinkeln und kann auch zum Testen von Gruppenunterschieden oder Wechselwirkungen verwendet werden. Der nicht-parametrische Test basiert auf einer Rangtransformation der Vektorgewichte. Zur Berechnung wurde das Chemotaxis and Migration Tool

der Firma ibidi verwendet, welches den nach Moore (1980) modifizierten Rayleigh-Test für Vektordaten implementiert.

4. Ergebnisse

4.1 Die Auswirkung von löslichem bovinem Fibronectin auf die subzelluläre Lokalisation von MRTF-A-GFP

Wie bereits in unserem Labor durch Voruntersuchungen in murinen Fibroblasten gezeigt wurde, transloziert MRTF-A-GFP nach der Zelladhäsion in den Zellkern, wobei dies abhängig von einer funktionierenden nukleären Aktinpolymerisation war (Plessner et al., 2015). In derselben Studie wurde gezeigt, dass die adhäsionsbedingte nukleäre Aktinpolymerisation von einem funktionierenden Integrin-Signalweg abhängig war. Die Frage, ob eine direkte Integrin-Stimulierung ebenso eine nukleäre MRTF-A-GFP Translokation bewirken kann, war Gegenstand der folgenden Untersuchungen. Eine direkte MRTF-A-GFP Translokation durch Fibronectin und eine mögliche Rolle für den LINC-Komplex in diesem Zusammenhang würde Implikationen für dieses Signalsystem in der Tumorzellinvasion nach sich ziehen.

4.1.1 Fibronectin bewirkt die nukleäre Translokation von MRTF-A-GFP

Zur Untersuchung des Integrin-Signalweges auf das Verhalten von MRTF-A wurde eine etablierte HT1080-Zelllinie verwendet, die ein Doxycyclin-induzierbares Plasmid mit MRTF-A-GFP stabil exprimiert, welches bereits in früheren Publikationen als geeignetes Modell benutzt wurde (Vartiainen et al., 2007). Unter Live-Beobachtung im konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurde ein MRTF-A-GFP Shuttling-Experiment durchgeführt, bei dem nach Fibronectin-Stimulation in 2,5-minütigen Abständen Aufnahmen gemacht wurden. Es zeigte sich hierbei eine deutliche und reproduzierbare nukleäre Akkumulation von MRTF-A-GFP, die nach etwa 15 Minuten ihren

Höhepunkt erreichte; nach 45 Minuten wurde das Fibronectin-enthaltende Medium gegen Fibronectin-freies Medium ausgetauscht, woraufhin MRTF-A-GFP zurück in das Zytosol lokalisierte (**Abb. 4**). Das Experiment wurde auf Objektträgern wiederholt, die nach 45 Minuten fixiert wurden; als Kontrolle wurde serum- und fibronectinfreies Medium verwendet. Die Auswertung zeigte einen signifikanten Effekt des Fibronectins und etwa eine Verdreifachung des Anteils an nukleär lokalisiertem MRTF-A-GFP in den Zellen (**Abb. 5 A und E**).

Da Tumorzellen mit erhöhter Expression von $\alpha 5\beta 1$ -Integrinen eine verstärkte MRTF-A-Kernlokalisierung aufweisen (Hermann et al., 2016) und gezeigt wurde, dass der LINC-Komplex beim MRTF-A-GFP Shuttling während der Adhäsion eine Rolle spielt (Plessner et al., 2015), sollten diese beiden Aspekte daraufhin untersucht werden, ob sie in diesem Zusammenhang einen möglichen Signalweg bilden. Der 4B4-Antikörper ist bereits als geeignete Methode etabliert, um das $\alpha 5\beta 1$ -Integrin zu blockieren; ebenso beschrieben ist die transiente Expression einer dominant negativ wirkenden KASH-Domäne (dn.KASH) zur Störung der Funktion des LINC-Komplexes (Plessner et al., 2015). Der Effekt dieser beiden Konditionen auf das Fibronectin-induzierte MRTF-A-GFP Shuttling war signifikant, jedoch nicht vollständig (**Abb. 5 B-E; siehe Diskussionsteil**).



Abb. 4 MRTF-A-GFP während der Stimulation mit löslichem Fibronectin

Abb. 4 Stabil und doxycyclin-induzierbare MRTF-A-GFP exprimierende HT1080-Zellen wurden über Nacht serum-starviert und am folgenden Tag in unter einem LSM800-Konfokalmikroskop mit 120µg/ml Fibronectin beinhaltenden serumfreiem DMEM stimuliert (0 min). Alle fünf Minuten wurde ein Bild aufgenommen und nach 45 Minuten erfolgte ein Washout, bei dem das Fibronectin beinhaltende Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht wurde.

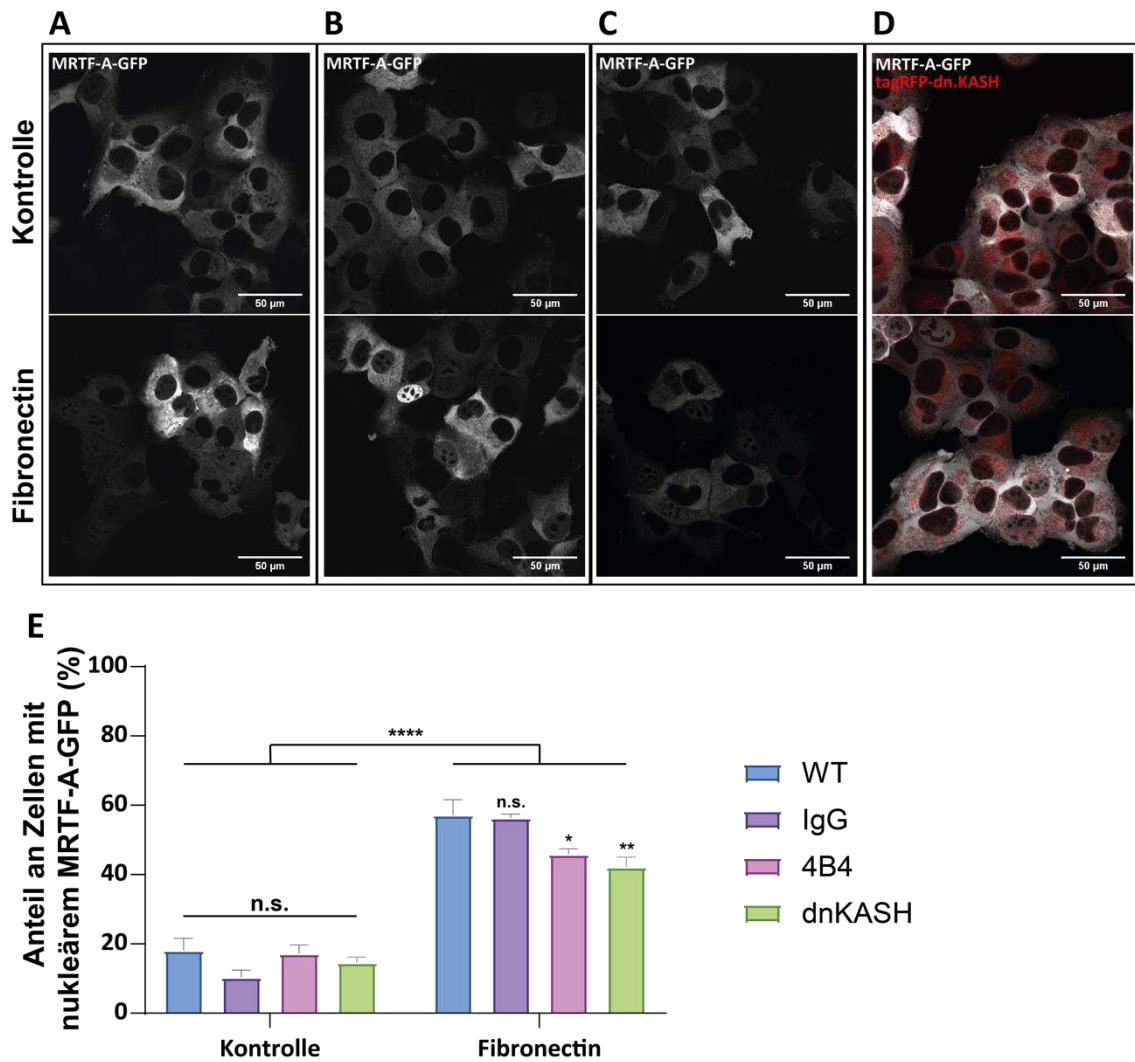


Abb. 5 Quantifizierung des Fibronectin-induzierten MRTF-A-GFP Shuttlings

Abb. 5 A-D zeigen repräsentative Beispiele fixierter MRTF-A-GFP-HT1080 Zellen unter verschiedenen Bedingungen 45 Minuten nach Stimulierung mit serumfreiem Medium (jeweils oberes Bild; *Kontrolle* in E) oder 120µg/ml Fibronectin beinhaltendem DMEM (jeweils unteres Bild; *Fibronectin* in E). **A** zeigt MRTF-A-GFP-HT1080. **B** zeigt MRTF-A-GFP-HT1080 mit unspezifischem IgG-Antikörper. **C** zeigt MRTF-A-GFP-HT1080 mit Integrin-blockierendem 4B4-Antikörper. **D** zeigt MRTF-A-GFP-HAT1080 unter transients Expression von tagRFP-dn.KASH. **E** zeigt die Quantifizierung von A-D nach manueller Kategorisierung (3 unabhängige Experimente). Eingezeichnet sind S.E.M. Es wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem multiplen Vergleichstest nach Sidak durchgeführt. Hierbei wurden die Konditionen in den Kontroll- und Fibronectin Gruppen jeweils mit WT und jede Kondition in der Kontrollgruppe mit der dazugehörigen in der Fibronectin Gruppe getestet. p-Niveaus für Asteriske: * = 0,001-0,05; ** = 0,0001-0,001; *** < 0,0001.

4.1.2 Die Dynamik der nukleären Aktinfraktion während der Fibronectin-stimulierten MRTF-A-GFP Translokation

Die kernständige Aktinfraktion kann durch Polymerisation im Zuge der Serumantwort ein deutliches Shuttling von MRTF-A in den Zellkern bewirken (Baarlink et al., 2013; Vartiainen et al., 2007) und Fibronectin-Stimulierung bewirkt in murinen Fibroblasten eine Integrin-abhängige Polymerisation von Aktinfilamenten (Plessner et al., 2015). Durch Ko-Expression des nAC-mCherry in den zuvor verwendeten MRTF-A-GFP-exprimierenden Zellen konnte die Dynamik der zellkernständigen Aktinfraktion während des Fibronectin-induzierten MRTF-A-GFP Shuttlings beobachtet werden (**Abb. 6 A**). Bei etwa jeder vierten Zelle konnte in diesem Experiment eine mit dem MRTF-A-Shuttling einhergehende nukleäre F-Aktin-Polymerisation beobachtet werden, wobei das Experiment nicht genügend oft wiederholt wurde, um eine aussagekräftige Testung durchzuführen (**Abb. 6 B**).

4.1.3 Die Aktivierung von fotostimulierbarem Rac1 bewirkt eine nukleäre Translokation von MRTF-A-GFP

Die Funktion der Rho GTPase Rac1 als Downstream-Aktivator der Integrin-Rezeptoren ist bekannt (Huveneers & Danen, 2009), und eine Interaktion mit Forminen wurde bereits beschrieben (Grikscheit, Frank, Wang, & Grosse, 2015; Kühn & Geyer, 2014), ebenso ist der Effekt aktiver Rac-Formen auf die MRTF-A/SRF Aktivierung beschrieben (Miralles et al., 2003). Es wurde in einem lichtinduzierbarem Experiment überprüft, ob eine gezielte Rac1-Aktivierung eine ähnliche Dynamik des MRTF-A-GFP Shuttlings bewirkt wie die Fibronectin-Stimulierung. Dies würde einen

Hinweis dafür liefern, dass das in der Fibronectin-Stimulierung beobachtete MRTF-A-GFP Shuttling durch Rekrutierung des Zytoskeletts mittels kleiner Rho GTPasen ausgelöst wird, wodurch die relativ schnelle Shuttling-Dynamik erklärt werden kann. Eine durch 488nm-Licht fotoaktivierbare Version von Rac1 (paRac1-mCherry) (Wu et al., 2009) ist in diesem Labor bereits etabliert (Grikscheit et al., 2015) und wurde im Folgenden verwendet. Für das Experiment wurde der Objektträger unter abgedunkelten Bedingungen in eine Inkubationskammer eines konfokalen Fluoreszenzmikroskopes überführt und minütlich eine Aufnahme im GFP-Kanal gemacht, wodurch gleichzeitig mit einer Aufnahme der MRTF-A-GFP Lokalisation eine Aktivierung des paRac1-mCherry durch das Exzitationslicht von 488nm im GFP-Kanal hervorgerufen wurde. Es konnte bereits nach zwei Minuten eine Translokation von MRTF-A-GFP in den Zellkern beobachtet werden, die nach 13 Minuten ihr Maximum erreicht hatte (**Abb. 7**); die Dynamik dieses Vorganges ähnelt dabei der durch externe Fibronectin-Stimulation, womit die Bedeutung der Integrin-Zytoskelett-Verbindung in diesem Signalweg verstärkt untermauert wird.

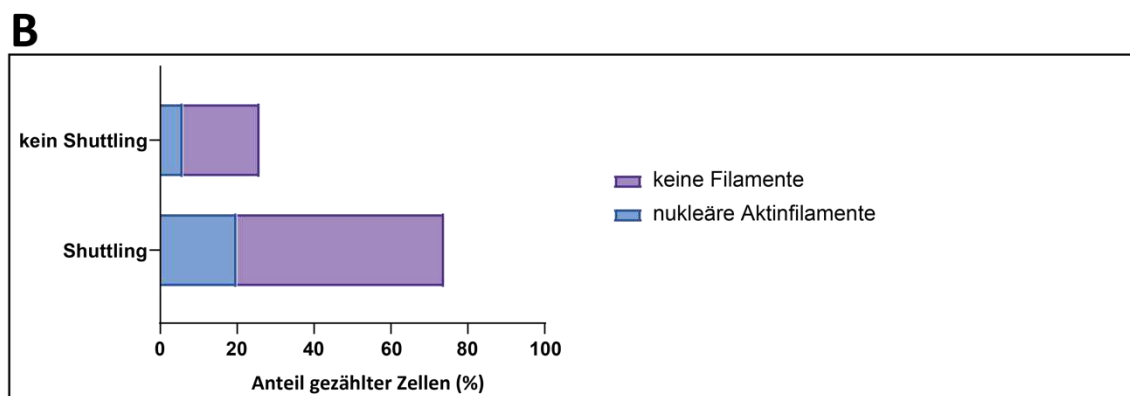
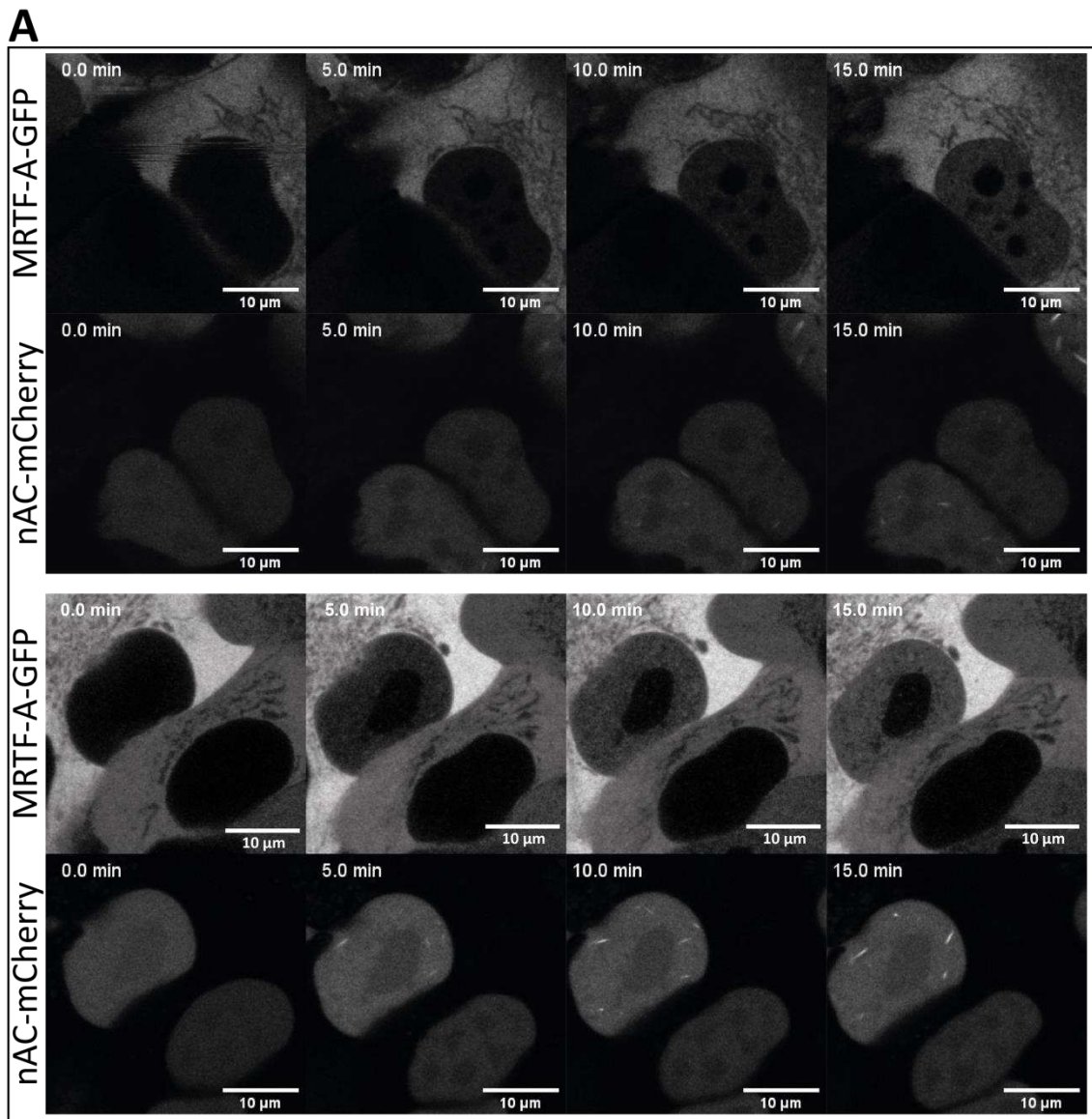


Abb. 6 Nukleäre Aktinfilamente während des Fibronectin-induzierten MRTF-A-GFP Shuttlings (Legende auf folgender Seite)

Abb. 6 MRTF-A-GFP HT1080 wurden mit nAC-mCherry transient ko-exprimiert, über Nacht serum-starviert und am nächsten Tag mit 120µg/ml Fibronectin enthaltendem DMEM stimuliert. **A** zeigt zwei exemplarische Zellen, bei denen zeitgleich mit einem MRTF-A-GFP Shuttling die Polymerisation von nukleären Aktinfilamenten zu sehen war. **B** zeigt die Quantifizierung des Shuttling-Verhaltens in Abhängigkeit vom Verhalten der nukleären Aktinfilamente (1 Experiment, kein Signifikanztest).

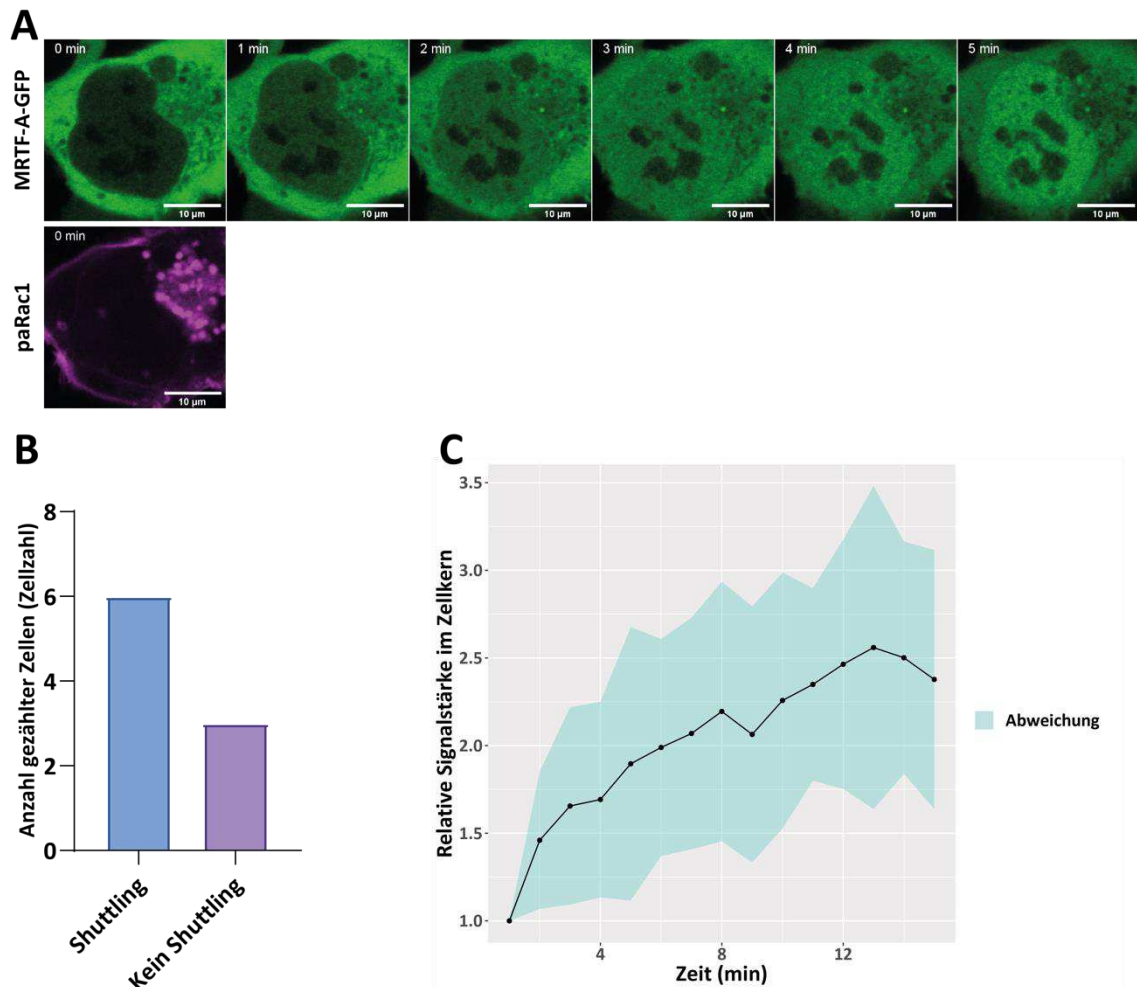


Abb. 7 paRac1 vermitteltes Shuttling von MRTF-A-GFP

Abb. 7 A zeigt ein repräsentatives Beispiel einer MRTF-A-GFP-HT1080 Zelle, die transient paRac1 exprimiert. Alle 60 Sekunden wurde ein Bild gemacht, wobei das 488nm-Licht des grünen Kanals das paRac1 stimuliert. **B** zeigt eine Quantifizierung des absoluten Shuttling-Verhaltens von MRTF-A-GFP unter Fotostimulation von paRac1 in 9 gemessenen Zellen (2 unabhängige Experimente) nach jeweils 15 Minuten. **C** zeigt den durchschnittlichen dynamischen Verlauf des MRTF-A-GFP Shuttling der 6 positiv klassifizierten Zellen durch Messung der nukleären Signalstärke im GFP-Kanal zu jedem Messzeitpunkt (alle 60 Sekunden). Eingezeichnet ist die Standardabweichung.

4.2 Die Etablierung eines Invasionsexperimentes zur Live-Beobachtung

Vor dem Hintergrund, dass eine Depletion von MRTF-A zu einer Herabsetzung der Migration von Tumorzellen in der Zellkultur führt (Medjkane et al., 2009), wurde die Frage gestellt, ob nukleäres Aktin als Regulator von MRTF-A ebenfalls einen Einfluss auf das zelluläre Invasionsverhalten hat. Um die Dynamik der nukleären Aktinfilamente und der MRTF-A-Lokalisation während der Invasion zu beobachten, wurde ein Invasionassay zur Live-Beobachtung etabliert. Hierzu wurde eine in unserem Labor bereits erprobte Methode modifiziert (nicht publiziert), sodass eine reliable Invasion beobachtet werden konnte. Die Invasionsmatrix wurde in ein μ -Channel der Firma ibidi gebracht und bestand aus einem Kollagen-Typ-1-Gemisch, in dem die Zellen in Richtung eines FCS- und Fibronectin-Gradienten invadierten. Durch Anwendung eines hochauflösenden konfokalen Fluoreszenzmikroskops konnten die Zellen und ihre subzellulären Strukturen ohne sichtbare Phototoxizität dargestellt werden; um eine hohe Auflösung und ein großes Beobachtungsfeld gleichzeitig aufzunehmen, wurde nur eine z-Ebene beobachtet, sodass nicht jede Zelle in ihrem kompletten Verlauf verfolgt werden kann, da nur ein Teil der dreidimensionalen Bewegung aufgezeichnet wurde. Die meisten Experimente wurden über einen Zeitraum von bis zu 18 Stunden aufgezeichnet und die Zellbewegung manuell am PC ausgewertet. Für die Auswertungen wurden pro Experiment alle Zellen nachverfolgt, die ab der ersten halben Stunde und mindestens die Hälfte der Laufzeit des Experimentes zu sehen waren. Ein typisches Invasionsexperiment ist in **Abb. 8** zu sehen.

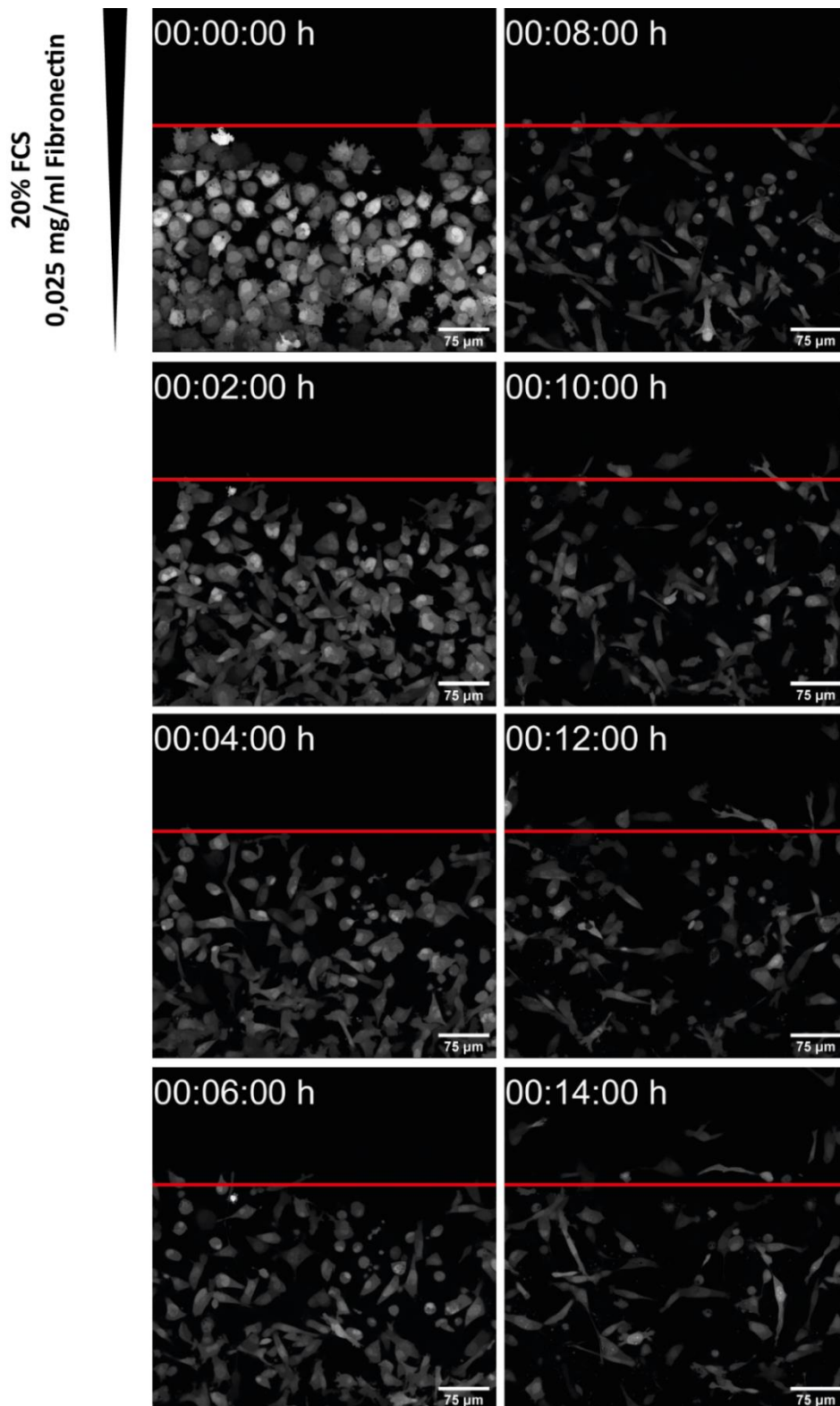


Abb. 8 Ein typisches Kollagen-Invasionsexperiment

Abb. 8 HT1080 wurden eine Stunde vor dem Experiment mit dem grün-fluoreszierenden Zytosolmarker CMFDA markiert und in die Invasionsmatrix gebracht (siehe Text). Die Abbildung zeigt den Verlauf eines Teiles der Invasionsfront über einen Zeitraum von 14 Stunden. Eingezeichnet ist die Zellfront zum Startzeitpunkt.

4.3 Die Dynamik von MRTF-A-GFP während der Tumorzellinvasion

Aufgrund der Ergebnisse der vorangegangenen Experimente war die Frage nach dem Shuttling-Verhalten von MRTF-A-GFP während der Invasion von Interesse. Der hier etablierte Invasions-Assay verwendet Kollagen Typ-1 und Fibronectin zur Bildung der Invasionsmatrix, sodass eine signifikante Aktivierung der Integrine erwartet wird. Da lösliches Fibronectin Kernaktinfilamente und ein klares MRTF-A-GFP-Shuttling auslöst, bestand die Hypothese darin, dass diese Phänomene auch in der Tumorzellinvasion stattfinden und beobachtbar sind. Zur zeitgleichen Beobachtung der kernständigen Aktinfraktion wurde die bereits verwendete MRTF-A-GFP-Zelllinie mit nAC-SNAP stabil ko-exprimiert. nAC-SNAP wurde in unserem Labor bereits etabliert (Baarlink et al., 2017) und eignet sich zur vielseitigen Einsetzung, da der SNAP-Tag ein Anfärben mithilfe von 647-SiR ermöglicht, womit der rote und blaue Kanal für weitere Experimentkonditionen offen bleiben.

Über Nacht serumstarvierte Zellen der oben erwähnten Zelllinie wurden im Invasionsexperiment über 14 Stunden beobachtet, wobei die Mehrzahl der Zellen ein dynamisches Shuttling von MRTF-A-GFP aufwiesen und diese Zellen im Verlauf ihrer Bewegung zu einem großen Teil nukleäre Aktinpolymerisation zeigten (**Abb. 9C**) - die zeitliche Korrelation war dabei nur tendenziell zu erkennen (**Abb. 9D**). Häufig wurden Verläufe beobachtet, in denen eine über längere Zeit andauernde nukleäre Aktinpolymerisation stattfand; mit schließlichem Sistieren der Filamentbildung kam es dann zum Anstieg des nukleären MRTF-A-GFP-Signals (**Abb. 9A und 9B**).

Die Beobachtung, dass vermehrtes MRTF-A-GFP Shuttling und nukleäre Aktinpolymerisation in invadierenden Zellen zu sehen ist, passt zum MRTF-

A/SRF-Signalweg, der für experimentelle Metastasierung benötigt wird und durch dynamische Aktin-Polymerisation im Kern gesteuert wird (Baarlink et al., 2013; Medjkane et al., 2009). Eine klare Korrelation von Kernaktinfilamenten und MRTF-A-GFP Shuttling konnte nicht belegt werden, zumindest nicht in der Art, wie sie vorher beschrieben ist oder unter kontrollierten Fibronectin-Konzentrationen in dieser Arbeit gesehen wurde (Baarlink et al., 2013; Plessner et al., 2015; vgl. **Abb. 6**). Eine gewisse zeitliche Verzögerung zwischen ersten nukleären Aktinfilamenten und dem Maximum des MRTF-A-GFP Shuttlings war auffällig und in **Abb. 9D** tendenziell zu erkennen, wobei das Shuttling häufig erst auftrat, als keine Filamente mehr zu sehen waren.

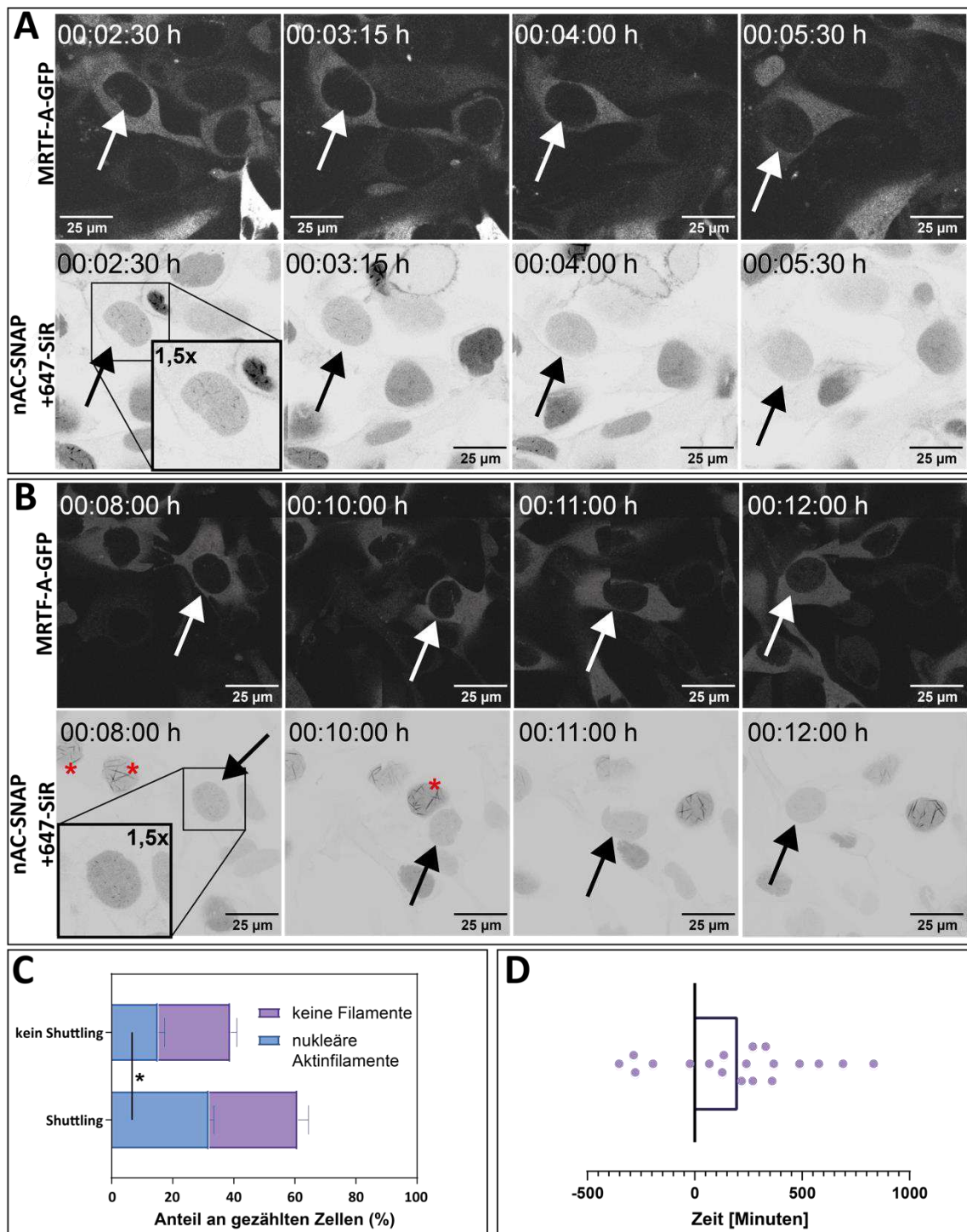


Abb. 9 Das MRTF-A-GFP Shuttling während der Kollagen-Invasion (Legende auf folgender Seite)

Abb. 9 A und B zeigen jeweils ein repräsentatives Beispiel eines Invasionsexperimentes, bei dem im MRTF-A-GFP Kanal ein Shuttling beobachtet werden kann (Pfeil), sowie die transiente Bildung von nukleären Aktinfilamenten (Pfeil). **C** zeigt die Quantifizierung der Zellen im Invasionsexperiment hinsichtlich des Shuttling-Verhaltens und der Bildung nukleärer Aktinfilamente über den kompletten Beobachtungszeitraum (3 Experimente, je 14 Stunden). Eingezeichnet sind S.E.M. Es wurde ein zweiseitiger t-Test zur Signifikanzbestimmung durchgeführt, hierbei wurde der Anteil an Filament-zeigenden Zellen zwischen den beiden Gruppen „Shuttling“ und „kein Shuttling“ überprüft. **D** Es wurde die Zeit zwischen ersten detektierbaren Kernaktinfilamenten und dem Maximum des MRTF-A-GFP-Shuttlings gemessen und aufgetragen. Die ausgewerteten Zellen entsprechen der Shuttling-positiven und Kernaktin-positiven Fraktion in **C**. p-Niveaus für Asteriske: $\ast=0,001-0,05$; $\ast\ast=0,0001-0,001$; $\ast\ast\ast<0,0001$.

4.4 Die Rolle der nukleären Aktinpolymerisation in der Zellinvasion

Die Funktion nukleärer Aktinpolymerisation in der Adhäsion ist bekannt (Plessner et al., 2015), und während der Experimente in 4.3.1 waren bereits nukleäre Aktinfilamente beobachtbar. In den folgenden Experimenten wurde die Bedeutung dieses Mechanismus näher erforscht.

4.4.1 Die Dynamik von nukleären Aktinfilamenten während der Zellinvasion

Die Dynamik der nukleären Aktinfilamente während der Zellinvasion sollte eingehender untersucht werden, um mögliche Korrelationen einer Polymerisation mit der Zellbewegung oder dem Auftreten von Zellmembranstrukturen zu erforschen, da beispielsweise die für die Zellmigration notwendigen Aktinstrukturen der Filopodien und Lamellipodien Transkriptionszielgene von SRF sind (Miano et al., 2007). Es wäre daher denkbar, dass die Steuerung dieser Membranstrukturen unter anderem durch das hier postulierte Integrin-Kernaktin-MRTF/SRF-System geschieht. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde eine HT1080-Zelllinie mit stabil exprimierendem nAC-SNAP etabliert, die kurz vor dem Experiment mit dem unspezifischen zytosolischen Farbstoff CMFDA markiert wurde, der eine differenzierte Abbildung der äußeren Zellstruktur ermöglicht. Aufgrund der deutlichen Anfärbung des Zytosols durch CMFDA, welche nur eine geringe Exzitation des LASERs benötigte, konnte die Belichtungszeit des 647nm-Kanals erhöht und damit die Qualität der Darstellung des Kernaktins verbessert werden. Deutliche und transiente Polymerisation von nukleären Aktinfilamenten war regelmäßig und reproduzierbar zu beobachten (**Abb. 10**). In **Abb. 10A** und **10C** sind motile Zellen erkennbar, bei denen die Ausbildung von Zellmembranprotrusionen mit der Darstellung von nukleären Aktinfilamenten einhergeht (weiße Pfeile

markieren die Membran, bzw. Protrusionen). Die Protrusionen bilden sich bei diesen beiden Beispielen in Migrationsrichtung der Zelle, was mit dem Aspekt eines Lamellipodiums übereinstimmen würde (Olson & Nordheim, 2010). In Abb. **10B** ist eine Zelle erkennbar, welche von einer anderen motileren Zelle bedrängt wird (rote Pfeile). Der Kern der bedrängten Zelle wird durch diese Bewegung mutmaßlich mechanisch beansprucht und es finden sich schließlich nukleäre Aktinfilamente. In Abb. **10D** ist eine Quantifizierung der Zellen mit neuen Protrusionen in Abhängigkeit von zeitlich korrelierter nukleärer Aktin-Polymerisation dargestellt. Es wurden hierbei solche Zellen von der Wertung ausgeschlossen, welche eine deutliche mechanische Einengung ihres Zellkerns durch äußeren Einfluss zeigten, um mögliche Effekte des mechanischen Stresses auf die nukleäre Aktin-Polymerisation auszuschließen. Tendenziell lässt sich hier eine Korrelation ausmachen, doch aufgrund der geringen Anzahl an gezählten Zellen wurde auf eine Signifikanztestung verzichtet.

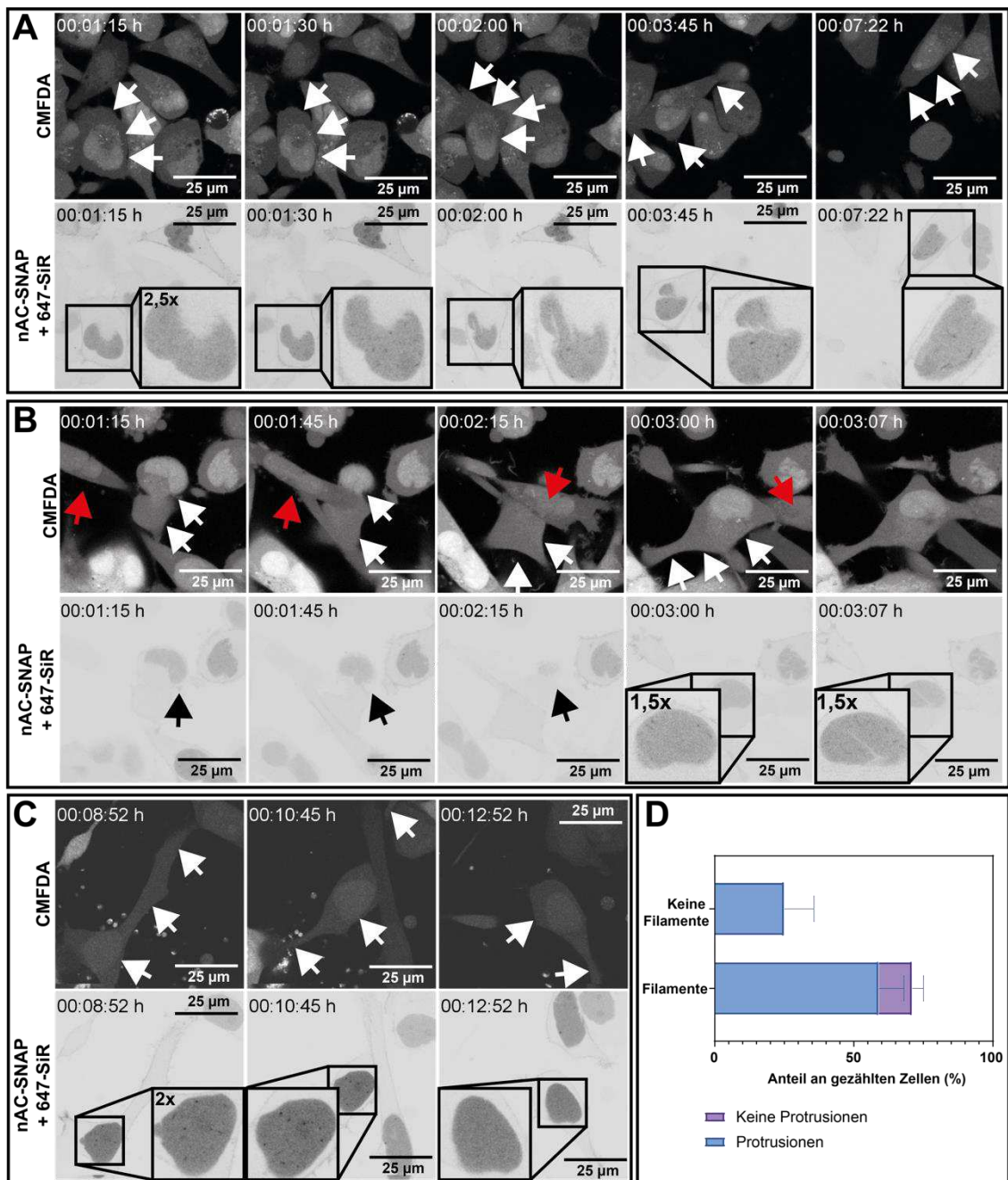


Abb. 10 Nukleäre Aktinfilamente zeigen sich während der Kollagen-Invasion (Legende auf folgender Seite)

Abb. 10 A-C zeigen repräsentative Beispiele invadierender HT1080, die stabil nAC-SNAP exprimieren und mit CMFDA markiert wurden. Weiße Pfeile markieren die Membranen der beobachteten Zelle, schwarze Pfeile markieren den Zellkern im nAC-SNAP-Kanal. Die roten Pfeile in **B** markieren eine Zelle, welche die mit weißen Pfeilen gekennzeichnete Zelle bedrängt. **D** zeigt die Quantifizierung der invadierenden Zellen in Hinblick auf neue Protrusionen und damit zeitlich korrelierender nukleärer Aktin Polymerisation (zeitliche Korrelation ist definiert als Auftreten neuer Protrusionen innerhalb von 15 Minuten vor oder nach neu aufgetretener nukleärer Aktin-Polymerisation). Eingezeichnet sind S.E.M. (27 Zellen aus vier unabhängigen Versuchen; keine Signifikanztestung).

4.4.2 Die Expression von BFP-NLS-actin-R62D verändert die Invasionsdynamik

In den vorherigen Experimenten wurden nukleäre Aktin-Filamente während der Invasion von Tumorzellen gesehen, wobei sie in Zusammenhang mit nukleärem MRTF-A-GFP Shuttling und der Ausbildung von Membranprotrusionen zu sehen waren. MRTF-A-GFP Shuttling und Membranprotrusionen sind mutmaßlich verknüpfte Mechanismen (Miano et al., 2007) und jeweils unabdingbar für eine effiziente Tumorzellinvasion (Medjkane et al., 2009; Olson & Nordheim, 2010). Es stellt sich die Frage, ob nukleäre Aktinpolymerisation eine Funktion in der Tumorzellinvasion besitzt. Zur Klärung dieser Hypothese wurden Invasionsexperimente unter zwei Konditionen durchgeführt, die zu einer herabgesetzten nukleären Aktinpolymerisation führen. Die Expression der nicht-polymerisierbaren Aktinmutante actin-R62D erfolgte kernspezifisch und mit fluoreszierendem Marker – es konnte nachgewiesen werden, dass eine solche Expression einen dominant negativen Effekt auf die Polymerisierbarkeit der nukleären Aktinfraktion hat (Baarlink et al., 2017; Posern, Miralles, Guettler, & Treisman, 2004). Die transiente Expression des Exportproteins Exportin6 hat einen signifikanten Einfluss auf die Menge an polymerisierbarem Aktin im Kern, wodurch eine funktionell ähnliche Kondition wie mittels Expression von actin-R62D erreicht wird (Baarlink et al., 2017).

BFP-NLS-actin-R62D (im Weiteren als NLS-R62D bezeichnet) wurde im Invasionsexperiment über einen Zeitraum von 14 Stunden gegen NLS-BFP kontrolliert, wobei beide Konditionen in stabilen und durch Doxycyclin induzierbar exprimierenden Zelllinien durchgeführt wurden (**Abb. 11 A und B**). Die transiente Expression von Exportin6-GFP erfolgte im Invasionsexperiment gegen die Kontrolle mit GFP über einen Zeitraum von

14 Stunden (**Abb. 11 C und D**). Zur Feststellung einer gerichteten Invasion wurden die gesammelten Invasionspfade mittels eines Vektor-gewichteten Rayleigh-Tests geprüft, welcher die Verteilung der Endpunkte auf eine nicht-uniforme und damit gerichtete Verteilung hin untersucht und dabei die Längen der einzelnen Vektoren mit einbezieht (Landler, Ruxton, & Malkemper, 2018; Moore, 1980). Als Maß für die Effizienz der Bewegung wurde die Direktionalität berechnet, welche der Quotient aus der absoluten Distanz zwischen Start- und Endpunkt und der akkumulierten Distanz ist (Semmling et al., 2010). Je näher dieser Quotient an 1 liegt, desto direkter und effizienter ist die Bewegung. Ein Wert für die effektive Bewegung in Richtung des Serumgradienten stellt der Forward Migration Index (FMI) dar, welcher als Quotient aus Distanz zwischen Start- und Endpunkt auf der y-Achse (in Richtung des Serumgradienten) und akkumulierter Distanz berechnet wird (Foxman, Kunkel, & Butcher, 1999). Ein positiver FMI würde für eine Bewegung in Richtung eines Serumgradienten sprechen und der Vergleich zwischen zwei Konditionen erlaubt einen Vergleich der Stärke dieser Bewegung.

Die jeweiligen Kontrollbedingungen BFP-NLS und GFP zeigten eine nicht-uniforme Verteilung ihrer Invasionspfade (**Abb. 11A und 11C**) und deutlich positive FMIs (**Abb. 11G**), womit auf eine funktionierende Migration in Richtung des Serumgradienten geschlossen werden kann. Die Konditionen mit gestörter nukleärer Aktin-Polymerisation zeigten jeweils eine uniforme Verteilung ihrer Invasionspfade (**Abb. 11B und 11D**) und im Vergleich mit ihren Kontrollen nicht-signifikant kleinere FMIs (**Abb. 11G**), welche einen weniger deutlichen positiven Ausschlag zeigten. Eine im Vergleich gestörte Bewegung in Richtung des Serumgradienten lässt sich somit für die Konditionen NLS-R62D und Exportin6-GFP implizieren.

Während die Geschwindigkeit der invadierenden Zellen in beiden Experimenten jeweils keine signifikanten Änderungen zeigten (**Abb. 11E**), waren unter NLS-R62D Expression signifikante Änderungen der Direktionalität der Zellbewegung zu sehen; während der Exportin6-GFP Expression war diese Messgröße nicht signifikant unterscheidbar von der Kontrollbedingung (**Abb. 11G**). In der Zusammenschau implizieren diese Messwerte eine Rolle für nukleäre Aktin-Polymerisation in der gerichteten und effizienten Tumorzellinvasion, wobei in den hier vorliegenden Experimenten die gerichtete Invasion und nicht die Motilität an sich (impliziert durch die Geschwindigkeiten) beeinflusst zu sein scheinen.

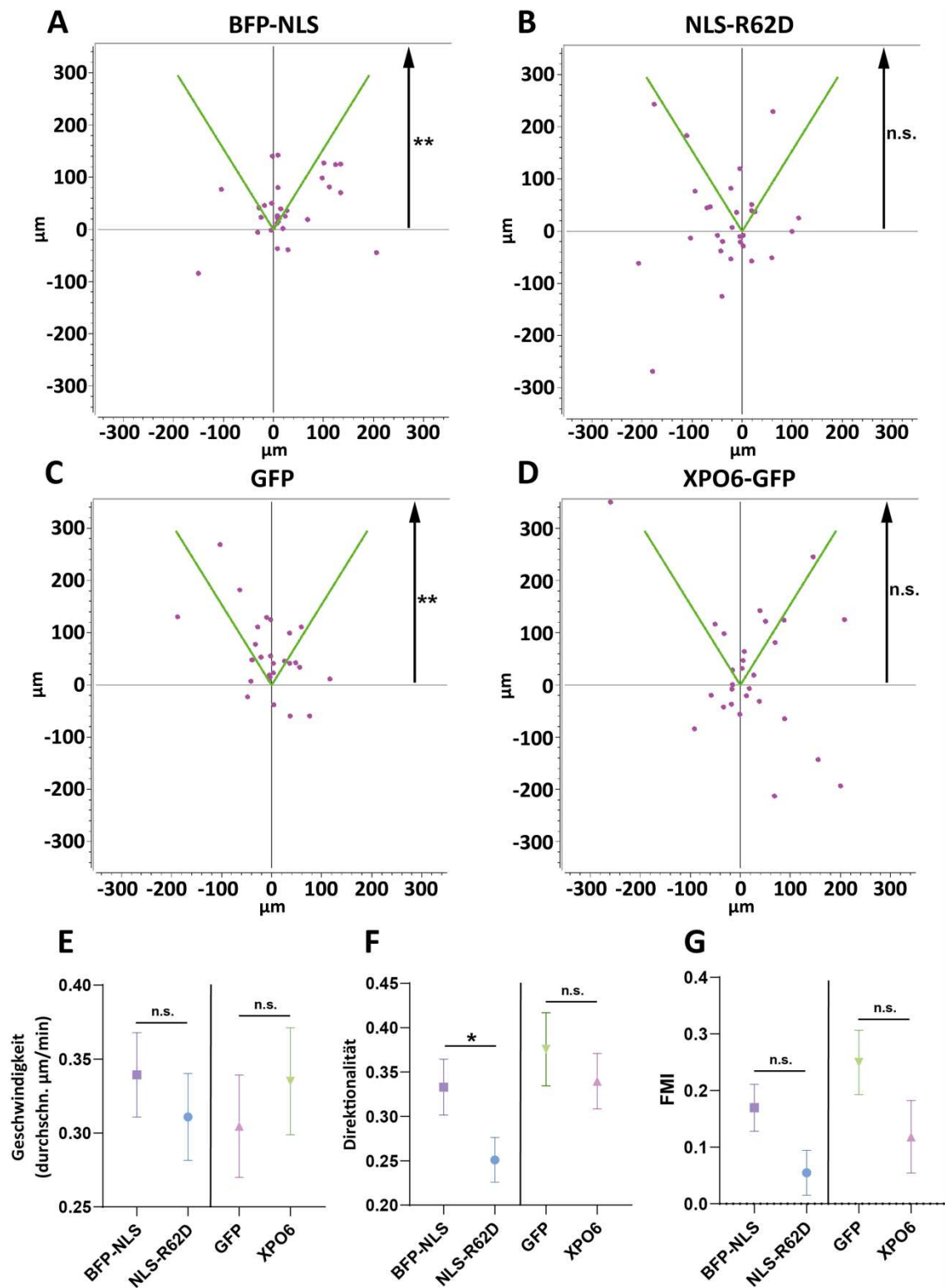


Abb. 11 Die Invasion unter Expression von BFP-NLS/NLS-R62D-BFP sowie GFP/XPO6-GFP (Legende auf folgender Seite)

Abb. 11 A-D Endpunkte aller auf einen Ursprung gesetzten Invasionspfade, eingezeichnet sind die Ergebnisse eines Vektor-gewichteten Rayleigh-Tests zur Signifikanzbestimmung der gerichteten Bewegung. Der grüne Winkel zeigt den 66° messenden Winkel in Richtung des Serumgradienten zur besseren Einschätzung der Streuung der Endpunkte. **A** stabil-induzierbare HT1080 mit BFP-NLS (31 Zellen) und **in B** NLS-R62D (29 Zellen). **C** HT1080 mit transienter Expression von GFP (28 Zellen) und **in D** XPO6-GFP (29 Zellen) **E-G** zeigen die Quantifizierung nach drei verschiedenen Parametern; Vergleich der Mittelwerte durch zweiseitigen t-Test (3 unabhängige Experimente, je 14 Stunden). Eingezeichnet sind Mittelwerte aller gezählten Zellen und S.E.M. **F** zeigt die Direktionalität als Quotient aus Euklidischer Distanz und Akkumulierter Distanz. **G** zeigt den Forward Migration Index (FMI) als Quotient aus Distanz auf der y-Achse (entsprechend der Richtung des Serumgradienten) und der Akkumulierten Distanz. Für Expressionskontrollen siehe Anhang 1. p-Niveaus für Asteriske: *=0,001-0,05; **=0,0001-0,001; ***<0,0001.

4.5 Die Blockade des LINC-Komplexes in der Zellinvasion

Ein gestörter LINC-Komplex hatte Auswirkungen auf das MRTF-A-GFP-Shuttling während der Fibronectin-Stimulierung (**Abb. 5**) und spielt eine Rolle bei der Adhäsions-bedingten nukleären Aktinpolymerisation, wobei ein funktionierender LINC-Komplex notwendig für eine korrekte Adhäsion ist (Plessner et al., 2015); außerdem nimmt er eine wichtige Aufgabe in der Mechanotransduktion ein (Khatau et al., 2012; Lombardi et al., 2011). Durch Interaktion mit der Kollagen/Fibronectin-Matrix unterliegen die Zellen in den Invasionsexperimenten dieser Arbeit einem ständigen Austausch zwischen Integrinen und Extrazellulärmatrix. Es wurden zudem membranöse Protrusionen und gerichtete Zellbewegungen beobachtet, welche funktionierende Integrin-Signale voraussetzen (Kechagia et al., 2019). Es folgt hieraus die Hypothese, dass der LINC-Komplex, ähnlich wie bei der adhäsionsbedingten nukleären Aktinpolymerisation, ein Teil der hier postulierten Integrin-Kernaktin-MRTF-A Signalkette ist und damit die Invasionfähigkeit der Tumorzellen beeinflusst.

Aus diesen Gründen wurde die Relevanz eines funktionierenden LINC-Komplexes für die Zellinvasion im Invasionsexperiment über 14 Stunden untersucht, hierbei wurde die transiente Expression von tagRFP-dn.KASH gegen die Kontrolle mit tagRFP getestet (**Abb. 12**). Es zeigte sich für beide Konditionen eine nicht-uniforme Verteilung der Invasionspfade (**Abb. 12A und 12B**) und positive FMIs (**Abb. 12E**), womit eine gerichtete Bewegung für beide Konditionen angenommen werden kann. Der durchschnittliche FMI für die tagRFP-dn.KASH Kondition stellt sich jedoch signifikant kleiner als der Wert für die Kontrollbedingung dar, sodass hier eine Abschwächung der gerichteten Invasion impliziert ist. Interessanterweise wurde für die tagRFP-dn.KASH Kondition eine signifikante Erhöhung der

Zellgeschwindigkeit gemessen (**Abb. 12C**) – ein deutlicher Effekt, der in den Experimenten mit gestörter nukleärer Aktin-Polymerisation in **Abb. 11** nicht gesehen wurde.

In transienter Ko-Expression mit der stabil exprimierenden, induzierbaren MRTF-A-GFP-Zelllinie zeigten tagRFP-dn.KASH-exprimierende Zellen eine signifikant geminderte MRTF-A-GFP-Kernlokalisation im Verlauf der Invasion (**Abb. 13**), womit eine funktionelle Relevanz des LINC-Komplexes für den hier postulierten Integrin-Kernaktin-MRTF-SRF Signalweg plausibel erscheint, wodurch auch die veränderte Invasionsstärke in **Abb. 12** erklärt werden kann.

Während der Experimente waren teilweise sehr starke Expressionsniveaus des tagRFP zu sehen, die zu Überbelichtungen in den Aufnahmen führten, weshalb ein Teil der Zellen von der Zählung ausgeschlossen werden musste.

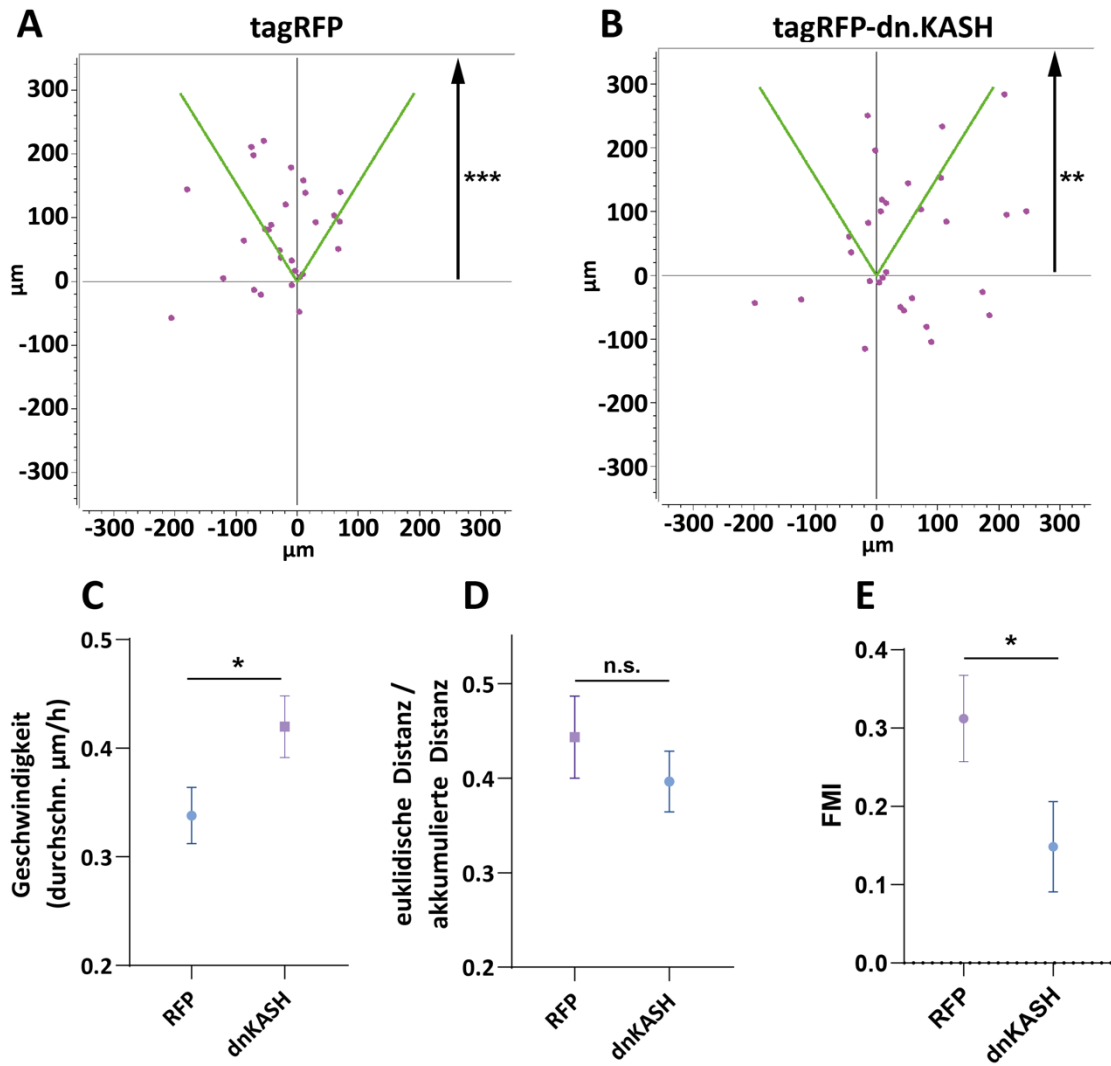


Abb. 12 Die Invasion unter Expression von tagRFP/tagRFP-dn.KASH

Abb. 12 A und B Endpunkte aller auf einen Ursprung gesetzten Invasionspfade, eingezeichnet sind die Ergebnisse eines Vektor-gewichteten Rayleigh-Tests zur Signifikanzbestimmung der gerichteten Bewegung. Der grüne Winkel zeigt den 66° messenden Winkel in Richtung des Serumgradienten zur besseren Einschätzung der Streuung der Endpunkte. **A** HT1080 mit transienter Expression von tagRFP (29 Zellen) und **in B** tagRFP-dn.KASH (30 Zellen). **C-E** zeigen die Quantifizierung nach drei verschiedenen Parametern; Vergleich der Mittelwerte durch einen zweiseitigen t-Test (3 unabhängige Experimente, je 14 Stunden). Eingezeichnet sind Mittelwerte aller gezählten Zellen und S.E.M. **D** zeigt die Direktionalität als Quotient aus Euklidischer Distanz und Akkumulierter Distanz. **E** zeigt den Forward Migration Index (FMI) als Quotient aus Distanz auf der y-Achse (entsprechend der Richtung des Serumgradienten) und der Akkumulierten Distanz. Für Expressionskontrollen siehe Anhang 2. p-Niveaus für Asteriske: $\ast=0,001-0,05$; $\ast\ast=0,0001-0,001$; $\ast\ast\ast<0,0001$.

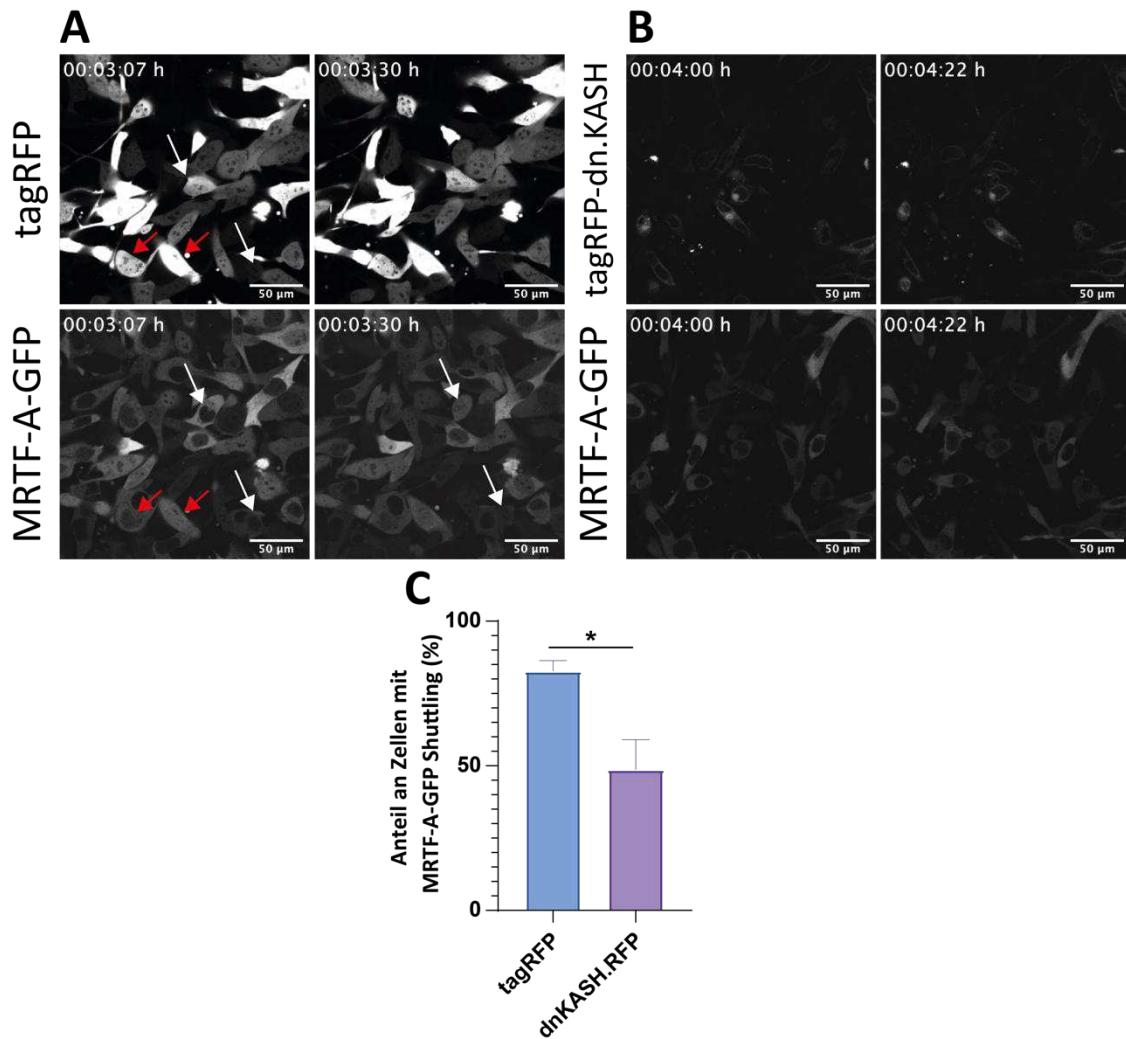


Abb. 13 Die Invasion unter Expression von tagRFP und tagRFP-dn.KASH: Das Verhalten von MRTF-A-GFP

Abb. 13 A zeigt das exemplarische MRTF-A-GFP Shuttling in MRTF-A-GFP HT1080 mit transient exprimierendem tagRFP. **B** zeigt das exemplarische MRTF-A-GFP Shuttling mit der transienten Expression von tagRFP-dn.KASH. **C** zeigt die Quantifizierung aus 3 unabhängigen Experimenten (tagRFP=28 Zellen; tagRFP-dn.KASH=32 Zellen; je 14 Stunden). Eingezeichnet sind Mittelwerte und S.E.M. Es wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Da das tagRFP einen signifikanten Bleed-through Effekt im GFP-Kanal aufwies, wurden nur solche Zellen untersucht, die ein transientes Shuttling des MRTF-A-GFP zeigten und zumindest zu einem Zeitpunkt einen signalfreien Kern zeigten, um Überlagerungseffekte auszuschließen. Beispiele für ausgeschlossene Zellen sind mit roten Pfeilen markiert, eingeschlossene Beispiele mit weißen Pfeilen. p-Niveaus für Asteriske: *=0,001-0,05; **=0,0001-0,001; ***<0,0001.

4.6 Die Interaktion invadierender Zellen mit der extrazellulären Matrix

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Rolle des Integrin-Zytoskelett-Signalwegs auf das Shuttlingverhalten von MRTF-A-GFP sowohl während der Fibronectin-Stimulierung wie auch in der Zellinvasion deutlich. Zu den Effektorproteinen von MRTF-A/SRF gehören auch zytoskelettale Proteine, die Integrine selbst steuern und Verbindungen mit der extrazellulären Matrix verstärken, wie beispielsweise Fokale Adhäsionen (Miano et al., 2007). Der Einfluss der nukleären Aktinpolymerisation, der in den Invasionsexperimenten bisher zeitlich nicht eindeutig mit dem MRTF-A-GFP Shuttling korreliert werden konnte, sowie die Bedeutung des LINC-Komplexes während der Invasion lassen die Frage aufkommen, ob diese beiden Systeme in der Mechanotransduktion invadierender Zellen eine Rolle spielen. Zur näheren Beleuchtung dieser beiden Aspekte wurde nach einem Verfahren gesucht, mit dem die Matrix der Invasionsexperimente dargestellt werden könnte, um Kontakte der Zellen mit den Kollagenfasern oder Einengungen der Zelle durch solche zu beobachten. FITC-Kollagen ist ein mit fluoreszierenden Markern versehenes Kollagen, das bereits zur Darstellung von Kollagenfasern verwendet wurde (Staudinger et al., 2013). Durch Hinzugabe des FITC-Kollagen zur Invasionsmatrix konnten Bedingungen geschaffen werden, unter denen Kollagenfasern im Invasionsexperiment zu sehen waren; hierbei wurden die Fasern auch plastisch von den invadierenden Zellen moduliert (**Abb. 14A und 14C**).

Durch die Anforderung an eine hochauflösende Darstellung der extrazellulären Matrix war es bisher nicht erfolgreich, das nukleäre Aktin in nAC-SNAP exprimierenden Zellen mit derselben Qualität darzustellen wie in den bisherigen Experimenten. Dennoch konnten bei einigen Zellen nukleäre Aktinfilamente visualisiert werden (**Abb. 14B**). Dieses

Invasionsexperiment könnte in weiteren Untersuchungen erlauben, die Ausbildungen fokaler Adhäsionen in Abhängigkeit vom Shuttlingverhalten des MRTF-A-GFP zu studieren. Mithilfe schonenderer und hochauflösender Mikroskopiertechniken wie einem konfokalen Spinning-Disk-Mikroskop wäre eine differenzierte Darstellung sowohl der extrazellulären Matrix als auch der kernständigen Aktinfraktion zu erreichen – womöglich auch in mehreren Tiefenebenen, womit ein umfassenderes und dreidimensionales Bild der unmittelbaren extrazellulären Umgebung während der Invasion möglich wäre.

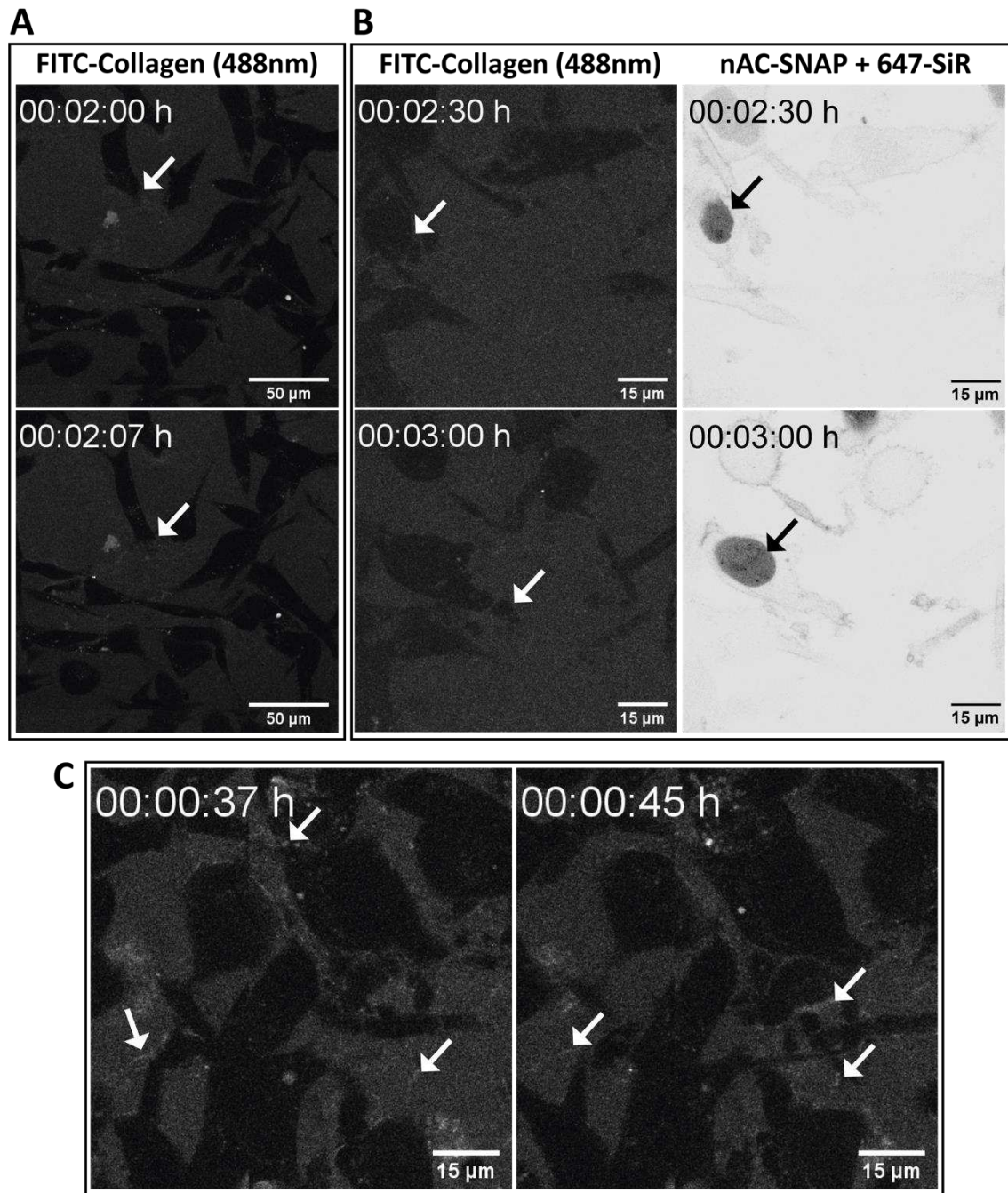


Abb. 14 Invasion in eine FITC-Kollagen-Matrix

Abb. 14 A-C zeigen repräsentative Beispiele aus einem HT1080 Invasionsexperiment mit FITC-markierter Kollagenmatrix. **A** zeigt beispielhaft die Veränderung der Kollagenmatrix nahe der Zellmembran bzw. vermeintlicher Lamellipodien (weiße Pfeile). **B** zeigt sichtbare nukleäre Aktin-Filamente, die zeitgleich mit einer Modulierung der Umgebung aufgenommen werden können (Pfeile markieren dieselbe Zelle in beiden Kanälen). **C** zeigt multiple Kollagenfibrillen, die den Raum bilden, in dem sich die Zellen befinden (weiße Pfeile).

5. Diskussion

5.1 Bestandteile der extrazellulären Matrix kommunizieren mit dem MRTF-A/SRF Komplex in humanen HT1080-Tumorzellen

Mit der Entdeckung, dass nukleäre Aktinpolymerisierung die subzelluläre Lokalisation von MRTF-A steuert (Vartiainen et al., 2007) und dies abhängig von *upstream* gelegenen Forminen ist (Baarlink et al., 2013), stellte sich die Frage nach den extrazellulären Signalwegen, die diesen Mechanismus beeinflussen könnten. In unserer Arbeitsgruppe konnten Plessner et al. (2015) in murinen Fibroblasten nachweisen, dass die physiologische Zelladhäsion auf Fibronectin-beschichteten Oberflächen unter Einbeziehung des LINC-Komplexes zu einer nukleären MRTF-A-GFP Akkumulation und einer markanten nukleären Aktin-Polymerisation führt. Hermann et al. (2016) haben zusätzlich gezeigt, dass Integrin-knockout Fibroblasten mit rekonstituiertem $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin eine erhöhte Transkription von MRTF-A/SRF-Zielgenen im Vergleich zu Integrin-knockout Fibroblasten aufweisen. Diese Beobachtungen implizieren einen potentiell interessanten Mechanismus für humane Tumorzellen, da deren Invasivität ebenso wie die zelluläre Adhäsion Integrin- und MRTF-abhängig ist und eine Rolle für die Mechanosensorik, beispielsweise über LINC-Vermittlung, wahrscheinlich erscheint (Hamidi & Ivaska, 2018; Medjkane et al., 2009). Die kernständige Aktinfraktion ist aufgrund der oben genannten Daten ein vielversprechender Mediator, sodass in den weiterführenden Experimenten ihre Rolle in der Invasion untersucht werden sollte.

Die Relevanz des Integrin-LINC-Kernaktin-MRTF Signalweges, wie er in Plessner et al. (2015) beschrieben wird, wurde folgend in humanen Fibrosarkomzellen untersucht (HT1080), da diese Zelllinie sich aufgrund

ihrer robusten und deutlichen Invasivität und der Erfahrung in unserem Labor (vor allem in Hinblick auf Untersuchungen des MRTF/SRF-Systems) für weiterführende Invasionsassays eignete (Brandt et al., 2009).

In der vorgelegten Arbeit konnte in stabil exprimierenden, Doxycyclin-induzierbaren MRTF-A-GFP HT1080 nachgewiesen werden, dass eine Stimulierung durch lösliches Fibronectin zu einer Akkumulation von MRTF-A-GFP im Zellkern führt und zeitgleich eine vermehrte nukleäre Aktinpolymerisation beobachtet werden kann (4.1.1 und 4.1.2). Die relativ niedrige Anzahl an Zellen mit nukleärer Aktinpolymerisation in **Abb. 6** kann durch suboptimale Aufnahmebedingungen erklärt werden, da für die zeitlich hohe Auflösung dieses Experimentes nicht die optimale Aufnahmequalität gewählt werden konnte, welche zur reliablen Darstellung der Aktin-Filamente wichtig ist.

Die Blockade der $\alpha 5 \beta 1$ -Integrine durch den spezifischen Antikörper 4B4 zeigte eine signifikante Abnahme des MRTF-A-GFP Shuttlings im Vergleich mit einem unspezifischem IgG-Gemisch, jedoch trat eine zu erwartende vollständige Blockade nicht auf. Eine Erklärung hierfür wäre, dass der 4B4-Antikörper eine Stunde vor Experimentbeginn in das Zellmedium gegeben und das Zellmedium mit Beginn des Experimentes gegen das Fibronectin-enhaltende Medium ausgetauscht wurde; es ist möglich, dass dieser Mediumaustausch ein signifikantes Auswaschen des Antikörpers bewirkt hat, womit der schwache Effekt der 4B4-Kondition entstanden sein könnte.

Eine Störung des LINC-Komplexes durch transiente Expression von tagRFP-dn.KASH führt in der Fibronectin-Stimulation zu einer herabgesetzten MRTF-A-GFP-Lokalisation im Kern (4.1.1), wobei ein Wert wie unter Kontrollbedingungen nicht erreicht wurde. Eine denkbare Fehlerquelle ist

hier die Wahl der Kontrollbedingung, denn die Kondition wurde lediglich gegen MRTF-A-GFP und nicht gegen den transienten Expressionsvektor tagRFP getestet; womöglich hätte sich so bereits eine erhöhte nukleäre Translokation von MRTF-A-GFP gezeigt. Eine andere denkbare Erklärung wäre, dass die Aktivierung des Integrin-Signalweges nicht nur zu einer nukleären, sondern über kleine Rho-GTPasen auch zu einer zytosolischen Aktin-Polymerisation führt und der G-Actin-Pool somit auch unabhängig vom LINC-Komplex aufgebraucht wird und MRTF-A in den Zellkern gelangt (Miralles et al., 2003). Der Effekt ist dennoch deutlich signifikant, sodass in HT1080 von einer Rolle für den LINC-Komplex im Integrin-vermittelten MRTF-A-GFP Shuttling ausgegangen werden kann.

Der hier beobachtete Phänotyp ließ sich durch selektive Aktivierung von Rac1, welcher ein Downstream-Effektor des Integrin-Signalweges ist und für den ein Effekt auf das MRTF-Shuttling bereits gezeigt wurde (Miralles et al., 2003), replizieren (4.1.3). Interessant war hierbei die zeitliche Dynamik des MRTF-A-GFP Shuttlings, da diese nach Fotoaktivierung von Rac1 vergleichbar mit derjenigen des Fibronectin-induzierten Shuttlings war. Es lässt sich damit argumentieren, dass die Fibronectin-Stimulierung zu einer vollständigen Aktivierung der Downstream-Aktivatoren der Integrine führt.

Zusammenfassend fügen sich diese Beobachtungen in das durch Plessner et al. (2015) beschriebene Modell ein, welches beschreibt, wie Fibronectin-Signale aus der extrazellulären Matrix und die Integrin-vermittelte physiologische Zelladhäsion durch Rekrutierung des Aktin-Zytoskeletts und Mitwirken des LINC-Komplexes zu einer erhöhten Kernakkumulation von MRTF-A/SRF führen. Durch Einbezug der Daten von Hermann et al. (2016) ließe sich vermuten, dass somit auch die Transkription von SRF-Zielgenen erhöht wird. Dies hätte man beispielsweise in einem Luciferase-Reporter-

Assay untersuchen können, jedoch lag für diese Doktorarbeit der Fokus auf dem Verhalten der Tumorzellen, insbesondere der Bedeutung des postulierten Integrin-LINC-Kernaktin-MRTF Signalweges für das invasive Verhalten. Aus diesem Grund galten die Bemühungen im Folgenden der Etablierung eines geeigneten Invasion-Assays, in dem die Dynamik sowohl des nukleären Aktins als auch von MRTF-A-GFP untersucht werden kann.

5.2 Ein geeigneter Invasions-Assay zur Live-Beobachtung

Methoden des Live-Imagings in Bezug auf Invasion und Migration umfassen in Zellkultur-Arbeiten zumeist klassische Boyden-Chamber-Assays oder Scratch-Wound-Assays. Diese Methoden werden üblicherweise in Durchlichtmikroskopie durchgeführt und ermöglichen daher keine differenzierte Darstellung subzellulärer Strukturen. Zudem erfolgt die Invasion, bzw. Migration, in einer annähernd zweidimensionalen Umgebung (Kramer et al., 2013).

Die Etablierung einer reliablen Methode, in der invasives Verhalten in einer möglichst physiologischen Umgebung durchgeführt und Zellstrukturen wie das Aktin-Zytoskelett selektiv beobachtet werden können, war eine essentielle Aufgabe dieser Arbeit. Die invasive Kapazität von HT1080-Fibrosarkomzellen in ein ausgeformtes Kollagen-I Gel ist bekannt (Fisher et al., 2006), und Erfahrungen mit der Invasion von HT1080 sowie Nutzung von FCS (fetal calf serum) als Chemogradient wurden in unserem Labor bereits gesammelt (Brandt et al., 2009). Durch Vorarbeiten auf diesem Gebiet, die ebenfalls in unserem Labor geleistet wurden (nicht publiziert), waren μ -Slides der Firma ibidi als geeignete Objektträger identifiziert worden, da der 400 μ m messende Hauptkanal die Ausbildung eines soliden Gels ermöglicht

und mithilfe der auf beiden Seiten angebrachten Reservoirs durch Auffüllen mit verschiedenen konzentrierten Medien ein Chemogradient im Längsverlauf des Gels aufgebaut werden kann. Unter Verwendung eines modernen konfokalen LASER-Mikroskops (Zeiss LSM800) mit hoher Sensitivität war die Ausführung der Aufnahmen mit geringer LASER-Stärke möglich, sodass phototoxische Reaktionen nicht zu beobachten waren.

Die Auswertung der Bildaufnahmen konnte aufgrund der hochauflösenden Bildqualität und relativ hohen zeitlichen Auflösung sowohl hinsichtlich der Invasionsdynamik als auch der subzellulären Strukturen durchgeführt werden. Die Auswertung der Zellbewegungen geschah manuell, da die sich häufig überlappenden und schlecht maschinell abgrenzbaren Zellen auf eine automatisierte Art nicht reliabel auswertbar waren. Um einen möglichen Bias in der Auswertung zu verhindern, wurden vorab Regeln formuliert, nach denen die Zellen verfolgt wurden (siehe Methodenteil). Eine Verblindung war nicht durchführbar, da in den quantitativen Experimenten einzig die fluoreszierenden Proteine der Expressions-Vektoren abgelichtet wurden; zum einen diente dies einer verringerten Phototoxizität, zum anderen wurde so sicher gestellt, dass in einer relativ kleinen Zellmenge nur positiv exprimierende Zellen ausgewertet wurden.

Zur Testung der Invasivität wurde als primärer statistischer Wert der Vektor-gewichtete Rayleigh-Test nach Moore (1980) durchgeführt. Mithilfe dieses Hypothesentests kann eine Aussage getroffen werden, ob die auf einen Kreis gemittelten Vektoren der Invasionspfade einer Kondition homogen (und damit ungerichtet) oder heterogen (und damit gerichtet) sind (Landler et al., 2018). In Zusammenschau mit dem Forward Migration Index, welcher einen Ausschlag der durchschnittlichen Bewegung entlang der y-Achse misst, und der bildlichen Darstellung kann so eine Aussage zu

der Frage getroffen werden, ob die Expression bestimmter Proteine die Fähigkeit einer Zellpopulation beeinflusst, dem FCS-Gradienten zu folgen. Die Direktionalität einer Zelle stellt eine Kenngröße für die Effizienz einer Zellbewegung dar; hierbei wird ein Quotient aus der Distanz zwischen End- und Startpunkt sowie der akkumulierten Wegstrecke gebildet. Je näher dieser Quotient an 1 liegt, umso direkter und somit zielführender, bzw. weniger zufällig, ist die Bewegung der Zelle. Die durchschnittliche Geschwindigkeit ist ein intuitiver Messwert und kann eine Aussage zur allgemeinen Motilität der Zellen machen, ohne einen Rückschluss auf die Invasivität zuzulassen.

5.3 Nukleäre Aktinpolymerisation spielt eine Rolle im invasiven Verhalten von HT1080-Tumorzellen

Medjkane et al. (2009) haben für MRTF-A/SRF eine klare Bedeutung in der Migration von Tumorzellen nachweisen können und wie bereits angesprochen, lieferten Plessner et al. (2015) und Hermann et al. (2016) Belege für einen Integrin-LINC-Kernaktin-MRTF-A Signalweg, welcher auch eine Rolle in der physiologischen Zelladhäsion spielt. Die Bedeutung dieses postulierten Signalweges und insbesondere der nukleären Aktin-Polymerisation für die Invasion ist aufgrund der zellbiologischen Nähe zur Adhäsion von bedeutendem Interesse, allerdings bisher nicht untersucht worden. Es wurden daher Invasionsexperimente mit Darstellung von MRTF-A-GFP und der kernständigen Aktinfraktion durchgeführt, ebenso quantitative Experimente unter funktioneller Hemmung der nukleären Aktin-Polymerisation.

Es zeigte sich ein deutliches und transientes nukleäres Akkumulationsphänomen von MRTF-A-GFP bei motilen Tumorzellen und ein bei diesen Zellen vermehrt beobachtbares Auftreten von nukleären Aktin-Filamenten (4.3.1). Eine zeitlich exakte Korrelation des MRTF-A-GFP Shuttlings mit der transienten nukleären Aktinpolymerisation ließ sich nicht darstellen; da die zeitliche Auflösung des Invasionsexperimentes bei 7,5 Minuten liegt, ist eine Korrelation unter diesen Bedingungen möglicherweise nicht durchführbar. Im Übrigen sind die Zellen im Invasionsexperiment einem ständigen und dynamischen Kontakt mit Fibronectin ausgesetzt, wodurch eine synchronisierte, prolongierte und stereotypisierte Stimulierung wie in **Abb. 4** nicht möglich ist.

Das Experiment in 4.4.1 dient der Darstellung und Untersuchung der Filamentdynamik und möglicher Assoziation mit der Form der Zelle. Mithilfe des zytosolischen Markers CMFDA war eine differenzierte Darstellung der Zellgrenzen möglich. Neu auftretende längliche Protrusionen der Zellmembran, welche häufig in Migrationsrichtung der Zellen auftraten und Lamellipodien darstellen könnten, waren häufig in Verbindung mit transients nukleärer Aktin-Polymerisation zu sehen. Da die Strukturproteine der Lamellipodien unter anderem durch SRF gesteuert werden (Miano et al., 2007), lässt sich hier der Schluss ziehen, dass die nukleäre Aktin-Polymerisation über MRTF/SRF zu einer Ausbildung der Lamellipodien führt. Zu einer definitiven Aussage hierüber würde eine Wiederholung dieses Experimentes unter Bedingungen mit nicht-polymerisierbarem Kernaktin führen, wobei hier nach einer Hemmung der Lamellipodienbildung ausgewertet werden sollte. In den Aufnahmen fielen zudem einige Gegebenheiten auf, in denen eine transiente nukleäre Aktinpolymerisation im Moment einer zellulären Bedrängung auftrat. Es

wurde bereits postuliert, dass nukleäre Aktin-Filamente durch mechanische Beanspruchung des Zellkerns entstehen (Plessner & Grosse, 2015), dies kann jedoch unter den hier gegebenen Bedingungen nur vermutet und nicht aussagekräftig behauptet werden, da dafür ein kontrollierter mechanischer Stress notwendig wäre.

Aufgrund der hier gestellten Beobachtungen und der Voruntersuchungen zur adhäsionsbedingten nukleären Aktin-Polymerisation wurde eine Funktion der nukleären Aktinfilamente für die Invasion vermutet und in 4.4.2 in zwei verschiedenen Experimenten quantitativ untersucht. Hierbei bildeten die Expression von NLS-actin-R62D und Exportin6 jeweils die Experimentkonditionen. Bei beiden Konditionen wurde bereits gezeigt, dass sie die nukleäre Aktinpolymerisation behindern können (Baarlink et al., 2017). Ein Unterschied in der durchschnittlichen Geschwindigkeit der Zellen war in beiden Experimenten nicht ersichtlich, womit die allgemeine Motilität nicht eingeschränkt zu sein scheint. Es konnte jedoch unter beiden Konditionen eine Hemmung der Invasivität beobachtet werden, sodass eine Rolle für die nukleäre Aktin-Polymerisation in der effektiven Invasion impliziert ist.

Integrine bilden Fokale Adhäsionen, welche als mechanischer Anker zwischen Lamellipodium und extrazellulärer Matrix dienen und die Lokomotion der Zelle bewerkstelligen. Die Ausbildung Fokaler Adhäsionen in den Lamellipodien am sogenannten *Leading Edge* der migrierenden Zelle ist mitverantwortlich für eine richtungsweisende Bewegung und steht in einem Wechselspiel mit dem Aktinzytoskelett und der nukleären Lokalisation von MRTF-A (Kechagia et al., 2019), womit mutmaßlich auch die kernständige Aktinfraktion eingebunden ist – ein Hinweis darauf lieferten die Beobachtungen in **Abb. 10**. Eine gestörte nukleäre Aktin-

Polymerisation und damit ein nicht adäquat funktionierendes MRTF/SRF-System könnte daher zu einer fehlerhaften und nicht dauerhaften Ausbildung von Lamellipodien und Fokalen Adhäsionen führen, womit die Etablierung einer konstanten und zielgerichteten *Leading Edge* erschwert wäre und zu einer ineffizienten und ungerichteten Invasion führen würde, wie sie in den NLS-R62D und XPO6-GFP Konditionen zu erkennen ist. Zu den Downstream-Effektoren der Fokalen Adhäsionen gehört auch der LINC-Komplex, der Teil des bereits postulierten Integrin-LINC-Kernaktin-MRTF Signalweges ist und als Mechanosensor die Kraftübertragung zwischen den Fokalen Adhäsionen und Zellkern bewerkstelligt (Kechagia et al., 2019). Es ist auf diese Weise denkbar, dass mechanisch oder durch Liganden stimulierte Integrin-Rezeptoren an Fokalen Adhäsionen zu einer Rekrutierung des zytosolischen Zytoskeletts führen und dieses über eine Koppelung an den LINC-Komplex eine nukleäre Aktin-Polymerisation und schlussendlich ein MRTF-A-Shuttling bewirkt, wie es in Zusammenhang mit der physiologischen Zelladhäsion in Plessner et al. (2015) und den hier beschriebenen Experimenten mit löslicher Integrin-Aktivierung durch Fibronectin in 4.1.1 beobachtet wird. Dieser potentielle Mechanismus ist auch für die Invasion interessant, insbesondere durch die hier beschriebene Beobachtung, dass nukleäre Aktin-Polymerisation und ein damit einhergehendes dynamisches MRTF-A-GFP Shuttling notwendig für eine effiziente Invasion zu sein scheint.

5.4 Die Einbindung des LINC-Komplexes in das hier beschriebene Modell

Khatau et al. (2012) haben gezeigt, dass die spontane Migration und Motilität von Fibroblasten durch einen gestörten LINC-Komplex

herabgesetzt wird, wobei auch eine verminderte Anzahl an Zellmembranprotrusionen gesehen wurde. Es liegt somit nahe, dass auch die Tumorzellinvasion durch einen gestörten LINC-Komplex beeinflusst wird. Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung von transient tagRFP und tagRFP-dn.KASH exprimierenden HT1080 Zellen im Live-Invasionsassay. In Übereinstimmung mit den in 5.1 und 5.3 diskutierten Daten zeigte sich ein vermindertes Shuttling von MRTF-A-GFP auch in invasiven HT1080 Tumorzellen unter tagRFP-dn.KASH Expression (4.5). Dies würde auf eine verminderte Transkription der SRF-Zielgene und somit eine eingeschränkte Invasionsfähigkeit schließen lassen, welche sich mithilfe des quantitativen Invasionsassays auch erkennen lässt, wobei eine abgeschwächte aber nicht gehemmte Invasionsfähigkeit gemessen wurde (**Abb. 12**). Überraschenderweise wurde eine signifikant erhöhte durchschnittliche Geschwindigkeit unter Expression von tagRFP-dn.KASH gemessen, wobei die Geschwindigkeiten in den bisherigen Experimenten ein sehr konstantes Niveau zeigten. Dieses Ergebnis wäre als Hinweis darauf zu werten, dass die HT1080 Tumorzellen mit einem gestörten LINC-Komplex motiler zu sein scheinen, obwohl sie eine weniger zielgerichtete Invasion vollziehen. Dies steht nicht in Einklang mit den Daten, die von Khatau et al. (2012) publiziert wurden, da hier eine herabgesetzte Geschwindigkeit unter Expression eines dominant negativ wirkenden KASH-Konstruktes gemessen wurde; diese publizierten Daten betrafen jedoch nicht zielgerichtet invadierende Tumorzellen, sondern die spontane Motilität von Fibroblasten. Es ist denkbar, dass die hier verwendeten humanen Fibrosarkomzellen bereits eine aufgrund verschiedener onkogener Mutationen stark veränderte generelle Motilität haben, welche sich durch Blockade des LINC-Komplexes nicht mehr heruntersetzen lässt.

Es wurde bereits vermutet, dass der LINC-Komplex eine schützende Funktion für den Nukleus ausübt und bei mechanischem Stress Schutzmechanismen ausführt (Lombardi et al., 2011; Tajik et al., 2016). Möglicherweise führt ein gestörter LINC-Komplex bei einer Tumorzelle, welche ohnehin eine gesteigerte Invasivität und verminderte Selbstschutzmechanismen besitzt, zu weniger vorsichtigem und damit schnellerem Migrationsverhalten.

Die herabgesetzte Invasivität und das verminderte MRTF-A-GFP Shuttling unter Expression von tagRFP-dn.KASH sprechen für eine Rolle des LINC-Komplexes im hier postulierten Integrin-LINC-Kernaktin-MRTF Signalweg. Weiterführende quantitative Analysen mit gleichzeitiger Untersuchung der nukleären Aktinfraktion, des MRTF-A-GFP Shuttlings und der Membranprotrusionen unter Expression des dominant negativ wirkenden KASH-Konstruktes würde ein abschließendes Bild dieses Signalweges zeichnen, welcher sowohl in der Adhäsion (Plessner et al., 2015) als auch in der Invasion eine entscheidende regulative Wirkung zu haben scheint.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Mithilfe der hier aufgezeigten Beobachtungen lässt sich eine differenzierte Vorstellung von der Funktion des LINC-Komplexes und dynamischer, transienter nukleärer Aktinpolymerisation generieren, welche als Vermittler zwischen Integrin-Aktivierung durch die Extrazellulärmatrix und

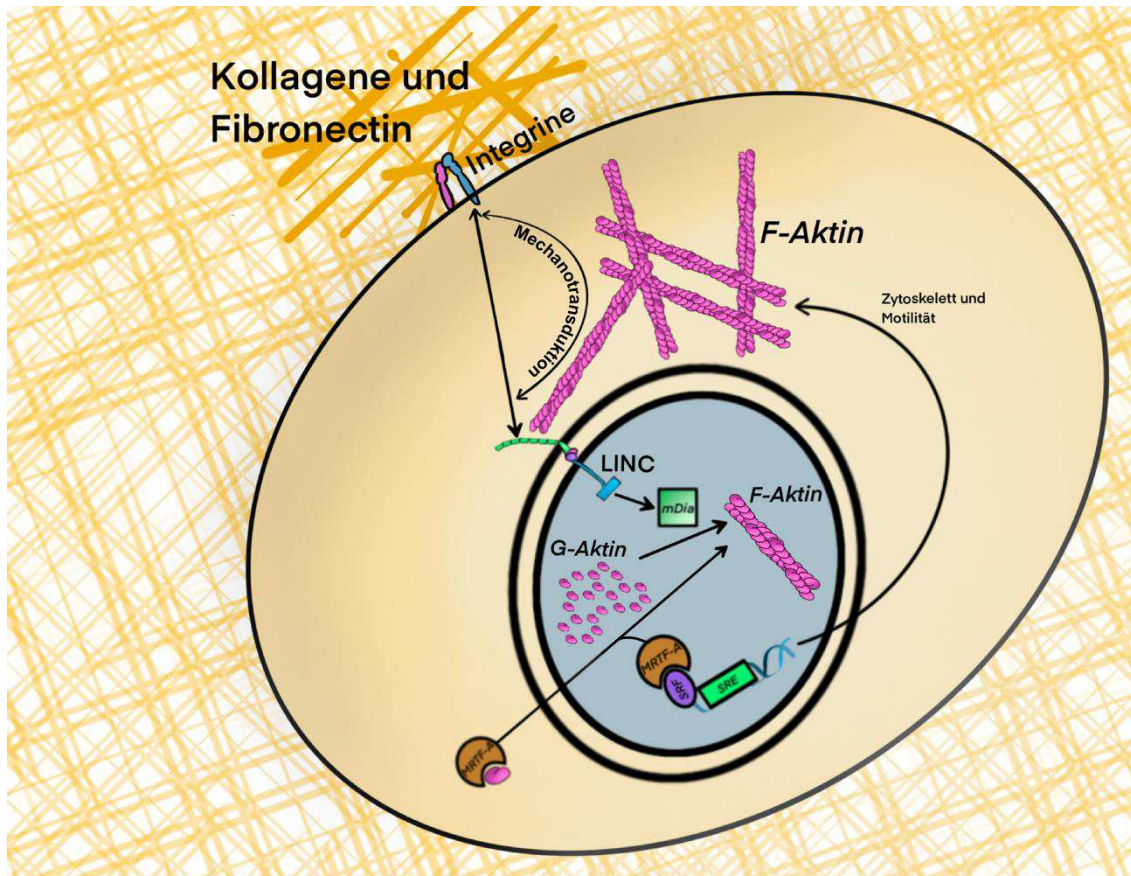


Abb. 15 Funktion des LINC-Komplexes und der nukleären Aktin-Polymerisation in der MRTF-A regulierten Tumorzellinvasion. Eigene Darstellung.

dem Verhalten des SRF-Koaktivators MRTF-A fungieren. Migrierende und invadierende Tumorzellen benötigen ein ständiges Feedback ihrer Umgebung und derer mechanischen Eigenschaften (Charras & Sahai, 2014), sodass ein adaptiver Mechanismus zur Steuerung der Invasion sinnvoll erscheint, welcher sich schnell an die Dynamik des extrazellulären Raumes anpassen kann.

Über Fokale Adhäsionen und Integrine wird das Zytoskelett an die Umgebung adaptiert, womit Kraft auf den LINC-Komplex übertragen wird, welcher diese Information schnell an den Nukleus weitergeben kann. Dieser Umstand spielt eine entscheidende Rolle bei der zellulären Adhäsion, da auf diese Weise der nukleäre G-Aktin-Pool durch schnelle Polymerisation depletiert wird und MRTF-A in den Zellkern gelangt, wo es mithilfe von SRF Effektorproteine der Adhäsion transkribiert (Plessner et al., 2015). Dieser Mechanismus lässt sich auch auf die Invasion übertragen, wenn man die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit betrachtet. Die Effekte der gehemmten nukleären Aktin-Polymerisation und LINC-Komplex-Störung auf die Invasion, sowie die Beobachtungen, dass nukleäres MRTF-A-GFP Shuttling vermehrt in invadierenden Tumorzellen auftritt und unter tagRFP-dn.KASH Expression herabgesetzt ist, sprechen für eine solche Bedeutung dieses Signalweges.

Unter Einsatz hochauflösender, zellschonend arbeitender Mikroskope und der Visualisierung der Kollagenmatrix durch FITC-Collagen, wie es in Abb. 14 gezeigt wurde, ließe sich in einigen weiterführenden Experimenten ein sehr genaues Bild dieses Mechanismus zeichnen, der vom Integrin-Kollagen-Kontakt über Einbezug des LINC-Komplexes bis hin zum MRTF-A-Shuttling durch dynamische nukleäre Aktin-Polymerisation und schlussendlicher zellmorphologischer Veränderung als Folge der vermehrten Transkription der SRF-Zielgene reicht. Ein solches vollständiges Bild eines neuen Signalweges, der im invasiven Verhalten von Krebszellen eine Rolle spielt, ist von signifikantem klinischen Interesse, da neu entdeckte Mechanismen der Tumorzellinvasion mit neuen Möglichkeiten zur Therapie und Diagnose maligner Erkrankungen einhergehen.

III. Zusammenfassung auf Deutsch

Die Bedeutung nukleärer Aktinfilament-Polymerisation für die Invasion von humanen Tumorzellen ist nicht geklärt und sollte in dieser Doktorarbeit erfasst werden. Es sollte zudem näher untersucht werden, welche Funktion in diesem Zusammenhang der *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton* (LINC)-Komplex an der Kernmembran als mögliche mechanosensitive Komponente einnimmt und ob der *Myocardin Related Transcription Factor A* (MRTF-A) eine spezifische Involvierung zeigt. Insbesondere von Interesse war hierbei ein möglicher Signalweg zwischen den zellmembranständigen Integrinen, welche in Kontakt mit der extrazellulären Matrix stehen, und der nukleären Aktinfraktion.

Zur Untersuchung der Fragestellung wurde auf verschiedene Methoden der molekularen Zellbiologie zurückgegriffen. Dabei wurden Möglichkeiten genutzt, um die Polymerisation der kernständigen Aktinfraktion zu unterbinden bzw. den LINC-Komplex zu stören und das Verhalten der Tumorzellen in humanen Fibrosarkomzellen (HT1080) anhand von Invasionsassays untersucht. Es wurde zu diesem Zweck ein Live-Invasionsassay etabliert, der eine qualitative Untersuchung der Zellen und ihrer subzellulären Strukturen während der Invasion in eine Kollagenmatrix in Echtzeit ermöglicht. Es wurden Methoden der endogenen Aktin-Anfärbung genutzt, mit denen eine differenzierte Darstellung der nukleären Aktinfilamente ermöglicht werden konnte, um die Dynamik der nukleären Aktinpolymerisation unter verschiedenen Bedingungen und in der aktiven Tumorzellinvasion zu studieren.

Es wurde unter anderem erstmalig beobachtet, wie sich während der Invasion und unter Fibronectin-Stimulierung nukleäre Aktinfilamente bilden und MRTF-A-GFP aktiv zwischen Zytosol und Zellkern wechselt. Durch

quantitative Untersuchungen und den damit einhergehenden Nachweis, dass gestörte Aktin-Polymerisation und ein gestörter LINC-Komplex mit einer weniger gerichteten Tumorzellinvasion in eine Kollagenmatrix korrelieren, ließ sich ein umfassendes und funktionelles Bild eines postulierten Integrin-LINC-Kernaktin-MRTF-A Signalweges zeichnen. Der Signalweg integriert somit mutmaßlich extrazelluläre Informationen und mechanische Signale, interagiert mit dem Aktinzytoskelett und ist wichtig für eine gerichtete, effiziente Invasion in eine Kollagen-Matrix.

Die Beschreibung dieses neuen Signalweges ermöglicht weitergehende Untersuchungen zum tieferen Verständnis der Interaktion von Tumorzellen mit der Extrazellulärmatrix und der Suche nach neuen Möglichkeiten der pharmakologischen Therapie onkologischer Erkrankungen.

IV. Abstract in English

To what extent nuclear actin polymerization is involved in tumor cell invasion is not yet known and this doctoral thesis aimed to study that question. Furthermore a possible mechanosensitive function for the *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton* (LINC)-Complex at the nuclear membrane and a specific involvement of *Myocardin Related Transcription Factor A* (MRTF-A) were investigated in this context. A postulated pathway between cell membrane anchored Integrins and the nuclear actin fraction was of special interest, as an integration of extracellular signaling might be possible that way.

In order to assess these questions a number of cell biological methods were used. The invasive behaviour of human fibrosarcoma cells (HT1080) was studied in a novel invasion assay which was established to quantitatively and qualitatively study invading cells and their subcellular structures in realtime. Different means of disrupting nuclear actin polymerization and the integrity of the LINC complex were used to investigate their possible functional implications in invasion. Studying nuclear actin filaments was made possible by using methods of endogenous nuclear actin colorization, allowing for differential visualization of live and endogenous filaments under various conditions in active tumor cell invasion.

For the first time nuclear actin filaments and the shuttling of MRTF-A-GFP were observed in invading HT1080 cells and in stationary cells using Fibronectin stimulation. Through use of quantitative studies a significant importance was shown for nuclear actin polymerization and the LINC-complex in efficient collagen matrix invasion. Putting together these observations, the description of an Integrin-LINC-nuclear-actin-MRTF-A pathway in tumor

cell invasion can be proposed. This signaling pathway possibly integrates extracellular information and mechanical signals. It interacts with the actin cytoskeleton and is of importance for an efficient collagen matrix invasion.

The description of this pathway opens up new possibilities in researching the interaction of invading tumor cells with the extracellular matrix and allows further investigations for possible new pharmacological targets in cancer therapy.

V. Literaturverzeichnis

- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., ... Yurchenco, P. D. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biology*, 24, 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.05.006>
- Baarlink, C., Brandt, D., & Grosse, R. (2010). SnapShot: Formins. *Cell*, 142(1), 172–172.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.030>
- Baarlink, C., Plessner, M., Sherrard, A., Morita, K., Misu, S., Virant, D., ... Grosse, R. (2017). A transient pool of nuclear F-actin at mitotic exit controls chromatin organization. *Nature Cell Biology*, 19(12). <https://doi.org/10.1038/ncb3641>
- Baarlink, C., Wang, H., & Grosse, R. (2013). Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL. *Science*, 340(6134), 864–867. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1235038>
- Baum, B., & Kunda, P. (2005). Actin Nucleation: Spire — Actin Nucleator in a Class of Its Own. *Current Biology*, 15(8), 305–308. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.002>
- Bettinger, B. T., Gilbert, D. M., & Amberg, D. C. (2004). Opinion: Actin up in the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(5), 410–415. <https://doi.org/10.1038/nrm1370>
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>
- Brandt, D. T., Baarlink, C., Kitzing, T. M., Kremmer, E., Ivaska, J., Nollau, P., & Grosse, R. (2009). SCAI acts as a suppressor of cancer cell invasion through the transcriptional control of β 1-integrin. *Nature Cell Biology*, 11(5), 557–568. <https://doi.org/doi:10.1038/ncb1862>
- Bravo-Cordero, J. J., Magalhaes, M. A. O., Eddy, R. J., Hodgson, L., & Condeelis, J. (2013). Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(7), 405–417. <https://doi.org/10.1038/nrm3609>
- Campbell, I. D., & Humphries, M. J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004994>
- Campellone, K. G., & Welch, M. D. (2010). A nucleator arms race: Cellular control of actin assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(4), 237–251. <https://doi.org/10.1038/nrm2867>

- Caridi, C. P., D'agostino, C., Ryu, T., Zapotoczny, G., Delabaere, L., Li, X., ... Chiolo, I. (2018). Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. *Nature*, 559(7712), 54–60. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0242-8>
- Chang, W., Worman, H. J., & Gundersen, G. G. (2015). Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *The Journal of Cell Biology*, 208(1), 11 LP – 22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1083/jcb.201409047>
- Charras, G., & Sahai, E. (2014). Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), 813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm3897>
- Chesarone, M. A., Dupage, A. G., & Goode, B. L. (2010). Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 62–74. <https://doi.org/10.1038/nrm2816>
- Condeelis, J., & Segall, J. E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature Reviews Cancer*, 3(12), 921–930. <https://doi.org/10.1038/nrc1231>
- Cooper, S. J., Trinklein, N. D., Nguyen, L., & Myers, R. M. (2007). Serum response factor binding sites differ in three human cell types. *Genome Research*, 17(2), 136–144. <https://doi.org/10.1101/gr.5875007>
- De La Cruz, E. M., Mandinova, A., Steinmetz, M. O., Stoffler, D., Aebi, U., & Pollard, T. D. (2000). Polymerization and structure of nucleotide-free actin filaments. *Journal of Molecular Biology*, 295(3), 517–526. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1999.3390>
- Desgrosellier, J. S., & Cheresch, D. A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 10(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>
- Dopie, J., Skarp, K.-P., Kaisa Rajakyla, E., Tanhuanpaa, K., & Vartiainen, M. K. (2012). Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9), E544–E552. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118880109>
- Edwards, M., Zwolak, A., Schafer, D. A., Sept, D., Dominguez, R., & Cooper, J. A. (2014). Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(10), 677–689. <https://doi.org/10.1038/nrm3869>
- Faix, J., & Grosse, R. (2006). Staying in Shape with Formins. *Developmental Cell*, 10(6), 693–706. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.05.001>

- Fisher, K. E., Pop, A., Koh, W., Anthis, N. J., Saunders, W. B., & Davis, G. E. (2006). Tumor cell invasion of collagen matrices requires coordinate lipid agonist-induced G-protein and membrane-type matrix metalloproteinase-1-dependent signaling. *Molecular Cancer*, 5, 1–23. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-69>
- Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463, 485–492. <https://doi.org/10.1038/nature08908>
- Foxman, E. F., Kunkel, E. J., & Butcher, E. C. (1999). Integrating conflicting chemotactic signals: The role of memory in leukocyte navigation. *Journal of Cell Biology*, 147(3), 577–587. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.3.577>
- Friedland, J. C., Lee, M. H., & Boettiger, D. (2009). Mechanically activated integrin switch controls $\alpha 5 \beta 1$ function. *Science*, 323(5914), 642–644. <https://doi.org/10.1126/science.1168441>
- Goley, E. D., & Welch, M. D. (2006). The ARP2/3 complex: An actin nucleator comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(10), 713–726. <https://doi.org/10.1038/nrm2026>
- Grikscheit, K., Frank, T., Wang, Y., & Grosse, R. (2015). Junctional actin assembly is mediated by Formin-like 2 downstream of Rac1. *Journal of Cell Biology*, 209(3), 367–376. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412015>
- Grosse, R., & Vartiainen, M. K. (2013). To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(11), 693–697. <https://doi.org/10.1038/nrm3681>
- Hamidi, H., & Ivaska, J. (2018). Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 18, 533–548. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>
- Hamidi, H., Pietila, M., & Ivaska, J. (2016). The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. *British Journal of Cancer*, 115, 1017–1023. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.312>
- Harburger, D. S., & Calderwood, D. A. (2009). Integrin signalling at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(2), 159–163. <https://doi.org/10.1242/jcs.018093>
- Hermann, M.-R., Jakobson, M., Colo, G. P., Rognoni, E., Jakobson, M., Kupatt, C., ... Fässler, R. (2016). Integrins synergise to induce expression of the MRTF-A–SRF target gene ISG15 for promoting cancer cell invasion. *Journal of Cell Science*, 129(7), 1391–1403. <https://doi.org/doi:10.1242/jcs.177592>

- Ho, C. Y., & Lammerding, J. (2012). Lamins at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(9), 2087–2093. <https://doi.org/10.1242/jcs.087288>
- Hofmann, W. A., Stojiljkovic, L., Fuchsova, B., Vargas, G. M., Mavrommatis, E., Kysela, K., ... de Lanerolle, P. (2004). Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nature Cell Biology*, 6(11), 1094–1101. <https://doi.org/10.1038/ncb1182>
- Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., & Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347, 44–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/347044a0>
- Huveneers, S., & Danen, E. H. J. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of Cell Science*, 122, 1059–1069. <https://doi.org/10.1242/jcs.039446>
- Hynes, R. O., & Naba, A. (2012). Overview of the Matrisome — An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, 1–16. <https://doi.org/doi:10.1101/cshperspect.a004903>
- Kanellos, G., & Frame, M. C. (2016). Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(17), 3211–3218. <https://doi.org/10.1242/jcs.187849>
- Kechagia, J. Z., Ivaska, J., & Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, 457–473. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0134-2>
- Khatau, S. B., Bloom, R. J., Bajpai, S., Razafsky, D., Zang, S., Giri, A., ... Wirtz, D. (2012). The distinct roles of the nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in three-dimensional cell migration. *Scientific Reports*, 2. <https://doi.org/10.1038/srep00488>
- Kovar, D. R., Harris, E. S., Mahaffy, R., Higgs, H. N., & Pollard, T. D. (2006). Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell*, 124(2), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.038>
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 752(1), 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.08.001>
- Kühn, S., & Geyer, M. (2014). Formins as effector proteins of Rho GTPases. *Small GTPases*, 5(3), e983876.1-e983876.15. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29513>

- Landler, L., Ruxton, G. D., & Malkemper, E. P. (2018). Circular data in biology: advice for effectively implementing statistical procedures. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 72(8). <https://doi.org/10.1007/s00265-018-2538-y>
- Li, S., Czubryt, M. P., Mcanally, J., Bassel-duby, R., Richardson, J. A., Wiebel, F. F., ... Olson, E. N. (2005). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(4), 1082–1087. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409103102>
- Lombardi, M. L., Jaalouk, D. E., Shanahan, C. M., Burke, B., Roux, K. J., & Lammerding, J. (2011). The Interaction between Nesprins and Sun Proteins at the Nuclear Envelope Is Critical for Force Transmission between the Nucleus and Cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 286(30), 26743–26753. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233700>
- Maciver, S. K., & Hussey, P. J. (2002). The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biology*, 3(5), 3007.1-3007.12. <https://doi.org/doi:10.1186/gb-2002-3-5-reviews3007>
- Medjkane, S., Perez-Sanchez, C., Gaggioli, C., Sahai, E., & Treisman, R. (2009). Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nature Cell Biology*, 11(3), 257–268. <https://doi.org/doi:10.1038/ncb1833>
- Meerbrey, K. L., Hu, G., Kessler, J. D., Roarty, K., Li, M. Z., Fang, J. E., ... Elledge, S. J. (2011). The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(9), 3665–3670. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019736108>
- Melak, M., Plessner, M., & Grosse, R. (2017). Correction: Actin visualization at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(9), 1688–1688. <https://doi.org/10.1242/jcs.204487>
- Miano, J. M., Long, X., & Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C70–C81. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00386.2006>
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A., & Treisman, R. (2003). Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL. *Cell*, 113(3), 329–342. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00278-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00278-2)
- Miyamoto, K., & Gurdon, J. B. (2013). Transcriptional regulation and nuclear

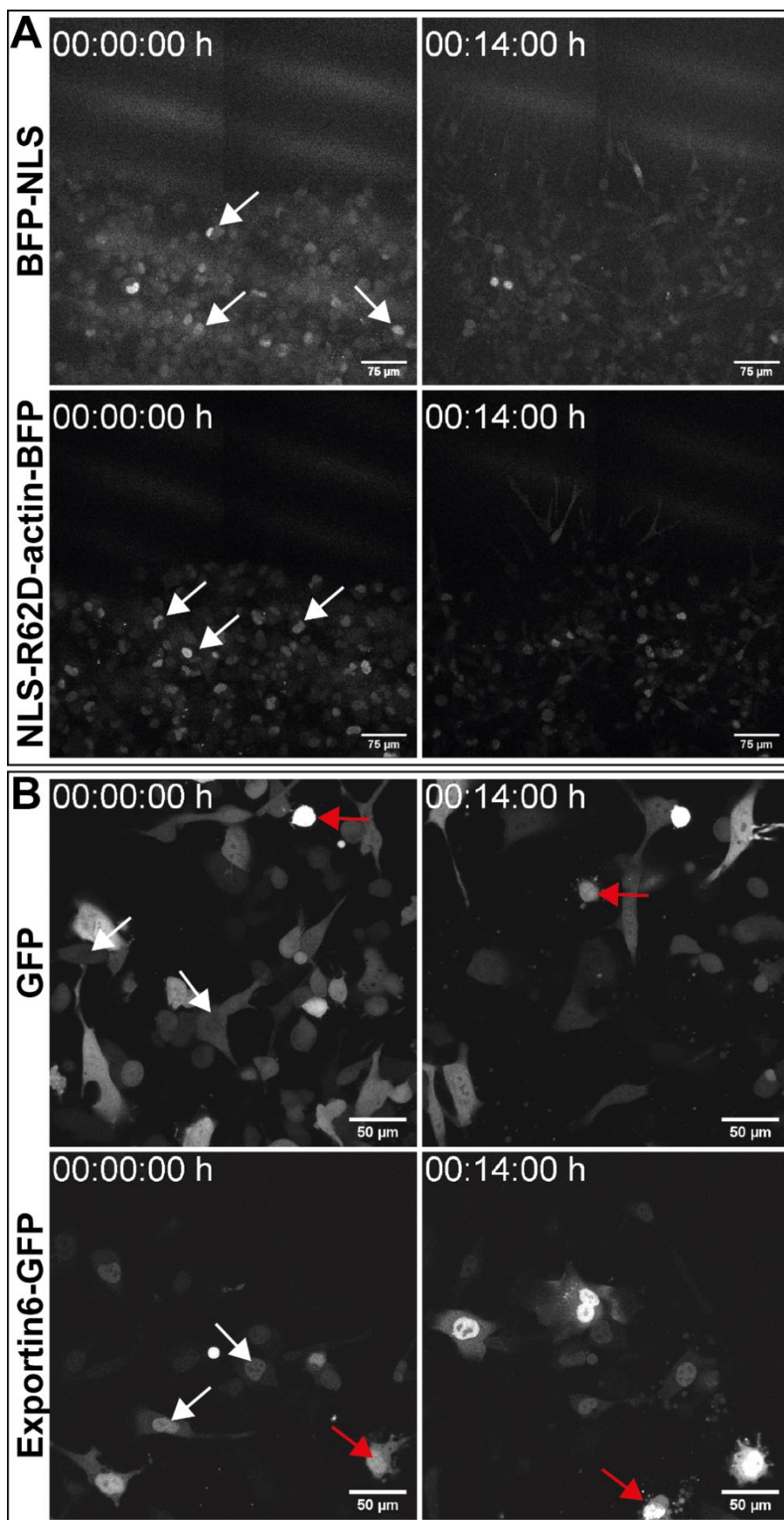
- reprogramming: roles of nuclear actin and actin-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(18), 3289–3302. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1235-7>
- Moore, B. R. (1980). A Modification of the Rayleigh Test for Vector Data. *Biometrika*, 67(1), 175–180. <https://doi.org/doi:10.2307/2335330>
- Olave, I. A., Reck-Peterson, S. L., & Crabtree, G. R. (2002). Nuclear Actin and Actin-Related Proteins in Chromatin Remodeling. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 755–781. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135507>
- Olson, E. N., & Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(5), 353–365. <https://doi.org/doi:10.1038/nrm2890>
- Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(20), 3861–3863. <https://doi.org/10.1242/jcs.00059>
- Percipalle, P. (2013). Co-transcriptional nuclear actin dynamics. *Nucleus (United States)*, 4(1), 1–10. <https://doi.org/10.4161/nucl.22798>
- Plessner, M., & Grosse, R. (2015). Extracellular signaling cues for nuclear actin polymerization. *European Journal of Cell Biology*, 94(7–9), 359–362. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.05.009>
- Plessner, M., Melak, M., Chinchilla, P., Baarlink, C., & Grosse, R. (2015). Nuclear F-actin Formation and Reorganization upon Cell Spreading. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11209–11216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.627166>
- Pollard, T. D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8, 1–17. <https://doi.org/doi:10.1101/cshperspect.a018226>
- Pollard, T. D., & Borisy, G. G. (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell*, 112(4), 453–465. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00120-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00120-X)
- Posern, G., Miralles, F., Guettler, S., & Treisman, R. (2004). Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *EMBO Journal*, 23(20), 3973–3983. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600404>
- Posern, G., & Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends in Cell Biology*, 16(11), 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.09.008>

- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., & Zigmond, S. H. (2003). Mechanism of Formin-Induced Nucleation of Actin Filaments. *Biochemistry*, 42, 486–496. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.019>
- Rankin, J., & Ellard, S. (2006). The laminopathies: A clinical review. *Clinical Genetics*, 70(4), 261–274. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00677.x>
- Rottner, K., Hänisch, J., & Campellone, K. G. (2010). WASH, WHAMM and JMY: Regulation of Arp2/3 complex and beyond. *Trends in Cell Biology*, 20(11), 650–661. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.014>
- Sahai, E. (2007). Illuminating the metastatic process. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 737–749. <https://doi.org/10.1038/nrc2229>
- Schiller, H. B., & Fässler, R. (2013). Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions. *EMBO Reports*, 14(6), 509–519. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.49>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schrank, B. R., Aparicio, T., Li, Y., Chang, W., Chait, B. T., Gundersen, G. G., ... Gautier, J. (2018). Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair. *Nature*, 559(7712), 61–66. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0237-5>
- Schwarzbauer, J. E., & DeSimone, D. W. (2011). Fibronectins, Their Fibrillogenesis, and In Vivo Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 1–20. <https://doi.org/doi:10.1101/cshperspect.a005041>
- Semba, S., Iwaya, K., Matsubayashi, J., Serizawa, H., Kataba, H., Hirano, T., ... Mukai, K. (2006). Coexpression of actin-related protein 2 and Wiskott-Aldrich syndrome family verproline-homologous protein 2 in adenocarcinoma of the lung. *Clinical Cancer Research*, 12(8), 2449–2454. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2566>
- Semmling, V., Lukacs-Kornek, V., Thaiss, C. A., Quast, T., Hochheiser, K., Panzer, U., ... Kurts, C. (2010). Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nature Immunology*, 11(4), 313–320. <https://doi.org/10.1038/ni.1848>
- Simon, D. N., & Wilson, K. L. (2011). The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic “network of networks.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(11), 695–708. <https://doi.org/10.1038/nrm3207>
- Staudinger, L. A., Spano, S. J., Lee, W., Coelho, N., Rajshankar, D., Bendeck,

- M. P., ... McCulloch, C. A. (2013). Interactions between the discoidin domain receptor 1 and $\beta 1$ integrin regulate attachment to collagen. *Biology Open*, 2(11), 1148–1159. <https://doi.org/10.1242/bio.20135090>
- Stüven, T., Hartmann, E., & Görlich, D. (2003). Exportin 6: A novel nuclear export receptor that is specific for profilin-actin complexes. *EMBO Journal*, 22(21), 5928–5940. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg565>
- Sun, Z., Guo, S. S., & Fässler, R. (2016). Integrin-mediated mechanotransduction. *Journal of Cell Biology*, 215(4), 445–456. <https://doi.org/10.1083/jcb.201609037>
- Tajik, A., Zhang, Y., Wei, F., Sun, J., Jia, Q., Zhou, W., ... Wang, N. (2016). Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nature Materials*, 15(12), 1287–1296. <https://doi.org/10.1038/nmat4729>
- Vartiainen, M. K., Guettler, S., Larijani, B., & Treisman, R. (2007). Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL. *Science*, 316(5832), 1749–1752. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1141084>
- Wang, W., Mouneimne, G., Sidani, M., Wyckoff, J., Chen, X., Makris, A., ... Condeelis, J. S. (2006). The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *Journal of Cell Biology*, 173(3), 395–404. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510115>
- Wang, Z., Wang, D., Pipes, G. C. T., & Olson, E. N. (2003). Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7129–7134. <https://doi.org/10.1073/pnas.1232341100>
- Wang, Z., Wang, D. Z., Hockemeyer, D., McAnally, J., Nordheim, A., & Olson, E. N. (2004). Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature*, 428(6979), 185–189. <https://doi.org/10.1038/nature02382>
- Wu, Y. I., Frey, D., Lungu, O. I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., & Hahn, K. M. (2009). A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature*, 461(7260), 104–108. <https://doi.org/10.1038/nature08241>
- Yamaguchi, H., & Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(5), 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.001>

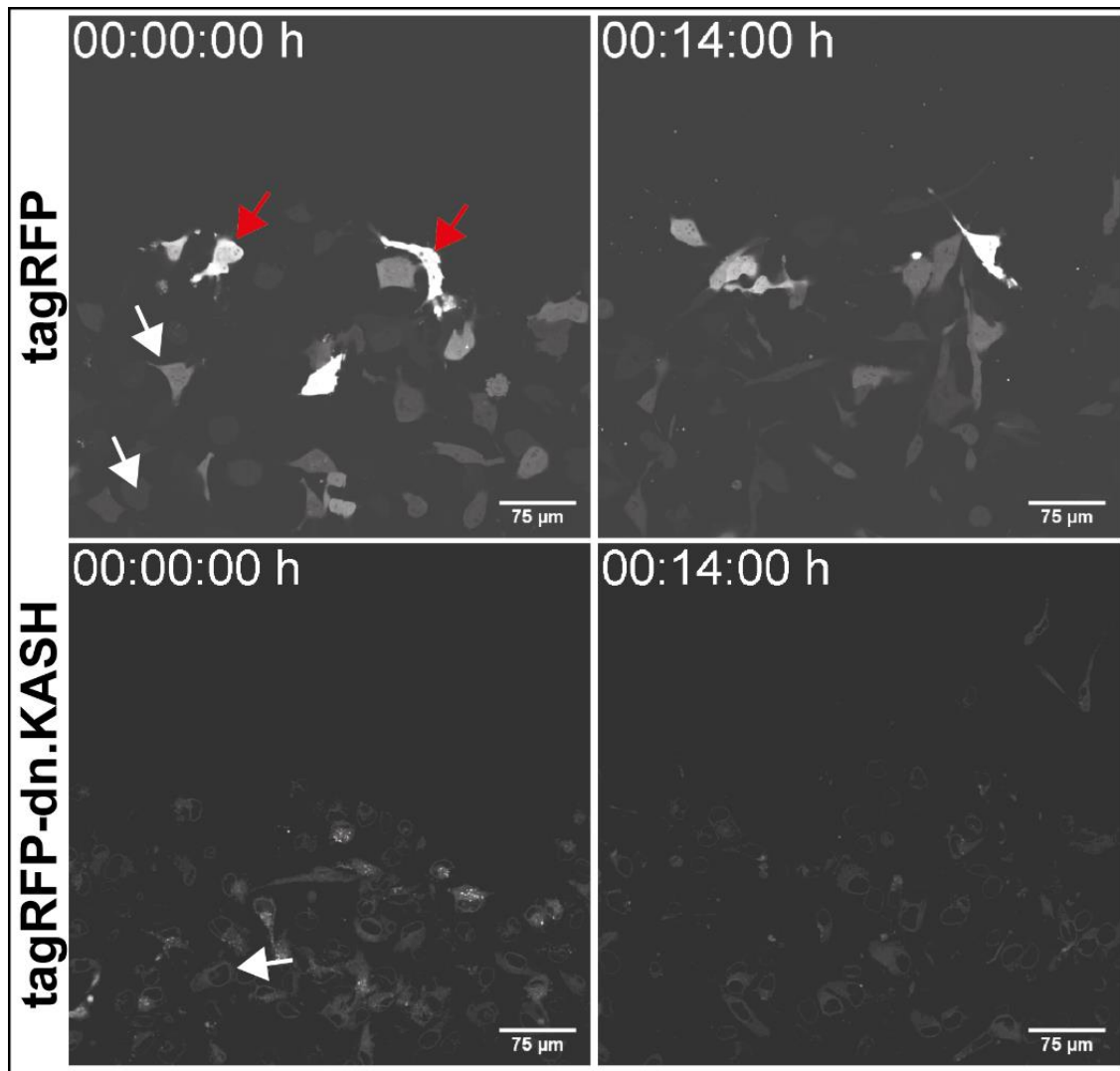
- Zhao, K., Wang, W., Rando, O. J., Xue, Y., Swiderek, K., Kuo, A., & Crabtree, G. R. (1998). Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell*, 95(5), 625–636. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81633-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81633-5)
- Zwerger, M., Ho, C. Y., & Lammerding, J. (2011). Nuclear Mechanics in Disease. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13, 397–428. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124736>

VI. Anhang



Anhang 1 Expressionskontrollen für Abb. 11 (Legende auf folgender Seite)

Anhang 1 A und B zeigen exemplarische und repräsentative Aufnahmen aus einem Invasionsexperiment, welches für Abbildung 12 ausgewertet wurde. Die weißen Pfeile zeigen beispielhaft Zellen, welche in die Bewertung eingeschlossen wurden; rote Pfeile markieren Zellen, welche aufgrund von Überexpression oder apoptotische Bläschen von der Bewertung ausgeschlossen wurden.



Anhang 2 Expressionskontrollen für Abb. 12

Anhang 2 Exemplarische und repräsentative Aufnahmen aus einem Invasionsexperiment, welches für Abbildung 13 ausgewertet wurde. Die weißen Pfeile zeigen beispielhaft Zellen, welche in die Bewertung eingeschlossen wurden; rote Pfeile markieren Zellen, welche aufgrund von Überexpression oder apoptotische Bläschen von der Bewertung ausgeschlossen wurden.

VII. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine Lehrer in Marburg waren:

Prof. Dr. Robert Grosse, Prof. Dr. Frank Czubayko, Prof. Dr. Timothy D. Plant, Prof. Dr. Thomas Worzfeld, Dr. Dominique T. Brandt, Dr. Matthias Plessner, Dr. Christian Baarlink, Dr. Ying Wang, Dr. Bing Zhao

Prof. Dr. Ralf Kinscherf, Prof. Dr. Dominik Oliver, Prof. Dr. Roland Lill, Prof. Dr. Oliver Hantschel, Prof. Dr. Rolf Müller, Prof. Dr. Kati Thieme, Prof. Dr. Max Geraedts, Prof. Dr. Annette Becker, Prof. Dr. Ho Ryun Chung, Prof. Dr. Stefan Bauer, Prof. Dr. Michael Lohoff, Prof. Dr. Stephan Becker, Prof. Dr. Harald Renz, Prof. Dr. Bernd Schmeck, Prof. Dr. Hinnerk Wulf, Prof. Dr. Michael Hertel, Prof. Dr. Carsten Denkert, Prof. Dr. Axel Pagenstecher, Prof. Dr. Johannes Schumacher, Prof. Dr. Andreas Mahnken, Prof. Dr. Markus Luster, Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabilic, Prof. Dr. Thomas Gress, Prof. Dr. Andreas Neubauer, Prof. Dr. Bernhard Schieffer, Prof. Dr. Joachim Hoyer, Prof. Dr. Claus Vogelmeier, Prof. Dr. Johannes Kruse, Prof. Dr. Ardawan Rastan, Prof. Dr. Steffen Ruchholtz, Prof. Dr. Rainer Hofmann, Prof. Dr. Detlef Bartsch, Prof. Dr. Uwe Wagner, Prof. Dr. Rolf Maier, Prof. Dr. Guido Seitz, Prof. Dr. Boris Stuck, Prof. Dr. Walter Sekundo, Prof. Dr. Lars Timmermann, Prof. Dr. Siegfried Bien, Prof. Dr. Christopher Nimsky, Prof. Dr. Katja Becker, Prof. Dr. Tilo Kircher, Dr. Claudia Schuckart, Dr. Marion Zimmermann

VIII. Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Robert Grosse für die Möglichkeit, in den Laboren seiner AG arbeiten und seine fortwährende Unterstützung und Lehre erfahren zu dürfen. Es ist sowohl ein außerordentliches Privileg als auch eine lehrreiche Herausforderung gewesen, diese Arbeit anfertigen zu können.

Mein Dank geht ebenso an alle Mitarbeiter des Instituts, welche mir vor allem in der holprigen ersten Zeit zur Seite standen; hierbei möchte ich besonders Dominique Brandt, Matthias Plessner, Andrea Wüstenhagen und Katharina Grikscheit erwähnen.

Für immerwährende Unterstützung möchte ich meiner Freundin Lena danken, welche mir zu allen Zeiten zur Seite stand und der emotionale und persönliche Stützfeiler dieser Arbeit war.

Meinen Eltern und meinen beiden Schwestern danke ich für die nicht abbrechenden Ermutigungen und Rückhalt über die letzten Jahre.